

(12)

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-506117

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)7月14日

(51) Int.Cl.* C 12 N 15/57 C 09 K 13/00 C 12 N 1/19 15/53	識別記号 Z N A	序内整理番号 7188-4H 7236-4B	F I
		9050-4B	C 12 N 15/00 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 51 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平4-509369  
 (86) (22)出願日 平成4年(1992)3月31日  
 (85)翻訳文提出日 平成5年(1993)9月14日  
 (86)国際出願番号 PCT/US92/02521  
 (87)国際公開番号 WO92/17595  
 (87)国際公開日 平成4年(1992)10月15日  
 (31)優先権主張番号 678, 916  
 (32)優先日 1991年4月1日  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
 DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL,  
 SE), AU, CA, JP

(71)出願人 ザ・ソーグ・インスティチュート・バイオ  
 テクノロジー／インダストリアル・アソシ  
 エイツ・インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州92037,  
 ラ・ホーラ, コースト・ブルヴァード・  
 サウス 505  
 (72)発明者 グレッソン, マーティン・アンソニー  
 アメリカ合衆国カリフォルニア州92130,  
 サン・ディエゴ, カーメル・ケイブ  
 12458  
 (74)代理人 弁理士 湯浅 勲三 (外6名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 ピキア (Pichia) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子およびその使用

## (57)【要約】

ピキア属の種のタンパク分解処理に関する遺伝子の単離と特性化について述べる。このような遺伝子の利用可能性が、タンパク分解活性の欠損した、タンパク分解感受性組換え産物の発現に宿主として有用であるピキア菌株の発生を可能にしている。ピキア属の種からの他の遺伝子の単離と特性化、並びにそれらの用途についても述べる。

## 特表平6-506117 (2)

請求の範囲

- ビヒア属の菌株から得られる单離DNAフラグメントであって、直接又は間接的に前記菌株のタンパク分解活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする遺伝子を含むDNAフラグメント。
- 前記タンパク質が前記菌株のカルボキシペプチダーゼY活性に影響を及ぼす請求項1記載のDNAフラグメント。
- 前記遺伝子が図1の制限地図を有する請求項2記載のDNAフラグメント。
- 前記フラグメントがプラスミドpEP202の約1.6kb p Eco RI フラグメントである請求項2記載のDNAフラグメント。
- 前記フラグメントが、前記菌株のカルボキシペプチダーゼY活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする、プラスミドpEP301の約2.7kb p Eco RI-Sac I フラグメント又はその部分である請求項2記載のDNAフラグメント。
- 前記遺伝子の前記核酸配列が配列1D No. 2に記載されるアミノ酸配列と実質的に同じであるアミノ酸配列をコードする請求項2記載のDNAフラグメント。
- 前記遺伝子の核酸配列が配列1D No. 1に記載される核酸配列と実質的に同じである請求項2記載のDNAフラグメント。
- 請求項1記載の遺伝子の改質形を含む单離DNAフラグメントであって、前記改質が遺伝子の機能産物の產生を不能にし、前記菌株のタンパク分解活性に影響を及ぼす、遺伝子産物の能力を変化させるDNAフラグメント。
- 前記遺伝子の改質形が相同的組み替えによるビヒア属の酵母宿主中の導入に適する請求項8記載のDNAフラグメントであって、その表現産物がタンパク分解活性に影響を及ぼす前記遺伝子の特定位において相同的組み替えが生ずるDNAフラグメント。
- 改質遺伝子が、その非改質形において、前記菌株のカルボキシペプチダーゼY活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする請求項8記載のDNAフラグメント。

p 20 から選択される請求項20記載の菌株。

22. 前記宿主菌株がヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子、アルギニンスクシノート リアーゼ遺伝子、又はオロチシン-5' -ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子から選択される少なくとも1種の栄養要求性マーカー遺伝子を欠き、前記フラグメントの改質遺伝子が宿主菌株に欠けている栄養要求性マーカー遺伝子の完全形のその中の挿入によって改質される請求項16記載の方法。

23. 請求項22記載の方法によって生成されるタンパク分解活性の欠損したビヒア菌株。

24. プロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼ活性との欠損した請求項23記載の菌株。

25. P. パストリスの菌株p1、p2、p5、p8、p13、p16又はp 20 から選択される請求項24記載の菌株。

26. 遺伝子の前記フラグメントがそれからの欠失の生成によって改質される請求項16記載の方法。

27. 前記宿主菌株がGS115であり、前記DNAフラグメントがプラスミドpDR401の約5.3kb p Sac I-Eco RI フラグメントである請求項22記載の方法。

28. ビヒア属の野生型菌株に比べて、タンパク分解活性の欠損したビヒア属の酵母細胞。

29. プロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼ活性との欠損した請求項28記載の酵母細胞。

30. タンパク分解感受性組換え産物の表現方法であって、前記産物をコードするDNAによって請求項28記載の細胞を形質転換させ、前記細胞を前記タンパク分解感受性産物が表現されるような条件下で培養することを含む方法。

31. 表現時に、前記宿主生物のカルボキシペプチダーゼ活性に直接又は間接的に影響を及ぼすタンパク質をコードする細胞の遺伝子を、前記宿主菌株の栄養要求性表型を構成するマーカー遺伝子の挿入によって改質される前記遺伝子の欠失形によって組換することによって、細胞のタンパク分解活性を欠損させ、かつマーカー遺伝子をヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子、アルギニンスク

1.1. 前記遺伝子がその中の栄養要求性マーカー遺伝子の挿入によって改質される請求項9記載のDNAフラグメント。

1.2. 前記栄養要求性マーカー遺伝子がビヒアもしくはサッカロミセスHIS4遺伝子、ビヒアもしくはサッカロミセスARG4遺伝子、又はビヒアもしくはサッカロミセスURA3遺伝子から選択される請求項11記載のDNAフラグメント。

1.3. 前記フラグメントがプラスミドpDR401中に含まれる請求項12記載のDNAフラグメント。

1.4. 前記遺伝子がそれからの欠失の生成によって改質される請求項9記載のDNAフラグメント。

1.5. 前記フラグメントがプラスミドpDR421中に含まれる請求項14記載のDNAフラグメント。

1.6. ビヒア属の宿主菌株に比べて、タンパク分解活性の欠損したビヒア菌株の形成方法であって、前記宿主菌株を請求項8記載のDNAフラグメントと、前記宿主菌株のゲノム中に前記DNAフラグメントを部位特異的組込みに適した条件下で接触させることを含み、前記部位特異的組込みがタンパク分解活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする前記遺伝子の特定位において生ずる方法。

1.7. 前記接触の結果として得られる菌株を、前記宿主菌株に比べて低いタンパク分解活性を有する菌株の存在に関して検査する工程と：

前記宿主菌株に比べて低いタンパク分解活性を有するような菌株を選択する肯定と

をさらに含む請求項16記載の方法。

1.8. 前記DNAフラグメントの組込みが前記宿主生物のプロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼ活性とに影響を及ぼす請求項16記載の方法。

1.9. 請求項16記載の方法によって形成されるタンパク分解活性の欠損したビヒア菌株。

20. プロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼ活性との欠損した請求項19記載の菌株。

21. P. パストリスの菌株p1、p2、p5、p8、p13、p16又は

シネット リアーゼ遺伝子、又はオロチジン-5' -ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子から選択する請求項30記載の方法。

3.2. 請求項18記載の方法を用いて宿主菌株のタンパク分解活性を欠損させることを含む、タンパク分解感受性組換え産物の表現方法であって、前記宿主菌株が少なくとも1種の栄養要求性マーカー遺伝子を欠き、かつ前記宿主菌株が転写の読み取りフレーム方向において、下記ヌクレオチド配列：

(1) メトロトローフ酵母のメタノール反応性遺伝子のプロモーター領域；

(2) 本質的に、

(a) 任意の分泌シグナル配列と、

(b) タンパク分解感受性タンパク質と

から成るポリペプチドをコードする配列と、  
(c) メトロトローフ酵母中の機能的転写終結因子と、  
を有する表現カセットを含む少なくとも1個のDNAフラグメントによって形質転換され、前記配列が前記ポリペプチドをコードする配列の終端に関して作用的に相互に関係する方法。

3.3. 前記宿主菌株が少なくとも2種の栄養要求性マーカー遺伝子を欠損する請求項32記載の方法。

3.4. 前記栄養要求性マーカー遺伝子がHIS4遺伝子とURA3遺伝子である請求項33記載の方法。

3.5. タンパク分解感受性産物がIGF-1であり、IGF-1をコードするDNAによる前記宿主の形質転換に用いられるマーカー遺伝子がHIS4遺伝子である請求項34記載の方法。

3.6. 宿主をタンパク分解活性欠損にさせるために用いられる改質遺伝子が、その非改質形において、宿主のカルボキシペプチダーゼ活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする請求項35記載の方法。

3.7. 改質遺伝子がコード配列の一節の欠失によって形成される請求項36記載の方法。

3.8. 前記組換え産物を表現する組換え菌株が菌株M+1MB206S1である請求項37記載の方法。

## 明細書

3.9. ピヒア属の種からのオルチジン-5' -ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子を含む单链DNAフラグメント。

4.0. 前記遺伝子が図12に示す地図と実質的に同じ制限地図を有する請求項3.9記載のDNAフラグメント。

4.1. 前記遺伝子が配列ID No. 4に記載した配列と実質的に同じアミノ酸配列をコードする請求項3.9記載のDNAフラグメント。

4.2. 前記遺伝子が配列ID No. 3に記載した配列と実質的に同じ核酸配列を有する請求項3.9記載のDNAフラグメント。

4.3. オルチジン-5' -ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子の欠損したピヒア属の酵母細胞。

4.4. 前記酵母細胞がピヒア パストリスの菌株である請求項4.3記載の酵母細胞。

4.5. 前記酵母細胞が菌株ピヒア パストリスGS 4-2である請求項4.4記載の酵母細胞。

4.6. さらにタンパク分解活性欠損を含む請求項4.3記載の酵母細胞。

4.7. プロティナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼ活性との欠損した請求項4.6記載の酵母細胞。

4.8. ピヒア パストリス菌株GS 4-2521-3/7又はGS 4-2521-4/1から選択される請求項4.7記載の酵母細胞。

ピキア (Pichia) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子およびその使用

## 技術分野

本発明は組換えDNA技術に関する。一つの特定の酵母において、本発明は組換え技術を用いて産生される酵母株および蛋白質分解プロセシングに含まれている蛋白質、ならびに独立栄養性マーカー蛋白質をコードしているDNAに関する。別の酵母において、本発明は組換え酵物、特に蛋白質分解されやすい組換え酵物を産生する方法に関する。

## 従来技術

ピキア (Pichia) 属の株は組換え酵物の生産のための有効な発現系として開発された。しかしながら、簡便しくないことに組換え法により希望通り産生されたいいくつかの蛋白質酵素（例えば、IGF-1, EGF, GPFなど）は宿主生物により産生されるプロテアーゼにより分解されやすい。そのような場合、高レベルの所望の生成物が発現されても、ある種の宿主株の蛋白質分解酵素の存在による生成物の分解により生成物の回収率の減少がしばしばおこる。生成物の回収は種々の蛋白質分解酵素の存在のために複雑である。

多くの組換え酵物の生産のためにピキア (Pichia)に基づく発現系を良好に作動させるためにはピキア (Pichia)のある種の蛋白質分解活性を減少または除去することが望まれるであろう。これにより、組換えピキア (Pichia)宿主中のプロテアーゼ感受性産物の分解の可能性が減少するであろう。分解の可能性の減少によりそのような酵物を実質的に無害の形で発現および回収する能力が促進されるであろう。

組換え体により生産される生成物の蛋白質分解の問題を減少または除去させるために種々の技術が応用できる。例えば、プロテアーゼ活性が阻害されるように組換え体株が増殖する条件を修正することができる。例えばこのことは種々のプロテアーゼ作用を阻害するのに十分なように培地のpHを調節することにより達成される。しかしながら、この方法はある種の組換え生成物を発現する宿主生物

の能力に（ならびに発現するやいなや、得られた生成物の安定度にも）影響を与えるであろう。さらに、この方法は細胞外蛋白質分解に対する効果のみに制限される。

また、組換えにより生産された蛋白質分解に敏感な生成物を分解する蛋白質分解活性に関与する宿主生物のプロセシング酵素のいくつかまたは全部を修飾または除去しようとする試みがある。しかしながら、真核生物における蛋白質分解過程は非常に複雑であり通常が保たれている。従って、蛋白分解プロセシング経路に含まれている1つまたはそれ以上の酵素の除去および/または修飾が宿主の生存度に、および/または組換えにより生産された生成物の安定度に対して影響を及ぼすかどうかを予測するのは不可能である。

酵母サッカロマイセス セレビジエ (Saccharomyces cerevisiae)のいくつかの蛋白質分解活性が特徴付けられている。例えば、プロティナーゼAはS. cerevisiae PEP4遺伝子によりコードされている。プロティナーゼAは液胞性アスピルチル プロテアーゼであり、自己活性化ならびにカルボキシペプチダーゼYおよびプロティナーゼBのような別の液胞性プロテアーゼを統合して活性化できる。カルボキシペプチダーゼYはこの酵素のプロティナーゼA媒介蛋白質分解プロセシング前では完全に不活性であるらしいが、プロティナーゼB (S. cerevisiae PRB-1遺伝子によりコードされている)はその前駆体形（酵素がプロティナーゼ媒介プロセシングを受ける前に存在する形）で約50%生物的に活性であると報告されている。

蛋白質分解活性を欠くS. cerevisiaeおよび糸状菌が異種ペプチドの組換え発現に使用されてきた。しかしながら、これらの生物はメチロトローフ酵母ピキア (Pichia)とは本質的に異なる。サッカロマイセス (Saccharomyces)、アスペルギルス (Aspergillus)およびピキア (Pichia)間には多くの代謝的および生理的相違が存在するため、これらの種々の生物の蛋白質分解プロセシング系は同じである必要はない。實際、ピキア (Pichia)内に存在する蛋白質分解活性の型に関しては現在ほとんど知られていない。

さらに、サッカロマイセス (Saccharomyces)またはアスペルギルス (Aspergillus)と異なって、異種ペプチドの組換え発現に使用されるピキア (Pichia)細胞は、典型的には高細胞密度で増殖され、それは少くとも一部には発酵過程の間の発泡を最少にする株を選択することにより可能である。そのような細胞の選択は培地内へ分泌される蛋白質の大きさを減少させて発泡をおさえらる量のエンドおよびエキソプロテアーゼを産生する細胞を選択することにより達成される。さらに、高細胞密度での増殖で異種ペプチドが高収率で得られるが、一方高細胞密度での増殖は発酵培地中に比較的高レベルの液胞性プロテアーゼを供給する。典型的には~1%の細胞が酵母死酵の間に溶離するので、高細胞密度は培地内へのかなりの量の細胞物質（液胞性プロテアーゼを含む）の放出を伴う。従って、高細胞密度法における異種ペプチドの生産の間に、ピキア (Pichia)により産生され、分泌されたいくらかの異種ペプチドは実質的な蛋白質分解をうける。

従って、ピキア (Pichia)のプロテアーゼ欠失株を提供することおよびそのような株を発生させる手段を提供するのが本発明の目的である。異種蛋白質の発現のためのプロテアーゼ欠失株の使用もまた本発明の目的である。

## 発明の概要

本発明に従うと、ピキア (Pichia)属の種の蛋白質分解過程に含まれている遺伝子が単離され、特徴付けされた。そのような遺伝子の有効性とは、蛋白質分解感受性生成物の発現のための宿主として有用である蛋白質分解活性が欠失したピキア (Pichia)の株を発生させる手段を提供することである。

酵母型ピキア (Pichia)細胞と比較して、蛋白質分解活性を欠失させるために修飾されたピキア (Pichia)の株は、蛋白質分解感受性生成物をコードしている組換え酵物の発現のための優れた宿主である。本発明で提供されるプロテアーゼ欠失宿主細胞中の低レベルの蛋白質分解活性と結合されたピキア (Pichia)発現系を用いる高レベルの組換え生成物発現の利点は、蛋白質分解感受性生成物の発生のための非常に有効な発現系を提供することである。

別の実施態様に従うと、ピキア (Pichia)オロチジン-5' -リン酸デカルボキシラーゼ蛋白質(URA3遺伝子)をコードしている遺伝子が提供され

## 特表平6-506117 (4)

### 発明の詳細な説明

本発明に従うと、ピキア (Pichia) 属の株の蛋白質分解活性に直接的にまたは間接的に影響する蛋白質をコードしている遺伝子を含む前記の株から得られた単離DNA断片が提供される。

本発明の別の実施態様に従うと、修飾されていない同じ種の宿主株に比較して蛋白質分解活性が欠失しているピキア (Pichia) 属の修飾株を作り出す方法が提供される、その方法は：

前記宿主株を上記遺伝子の修飾型（前記修飾はその遺伝子を機能的生成物が産生できないようにするか、または蛋白質分解活性に影響する遺伝子生成物の能力を変化させる）と接触させる（ここで前記の接触は前記宿主株のゲノム内への上記遺伝子の部位特異的組み込に適した条件下で実施され、前記部位特異的組み込は、蛋白質分解活性に影響する前記蛋白質をコードしている前記遺伝子の特定の座位で起こる）ことを含んでいる。

本発明のさらには別の実施態様に従うと、蛋白質分解活性が欠失したピキア (Pichia) 属の株が提供される。そのような株は色々な方法で産生できるが、現在そのような株を産生する良好な方法は上記の方法である。

本発明のさらには別の実施態様に従うと、蛋白質分解感受性組換え生成物の発現方法が提供され、前記方法は、前記蛋白質分解感受性生成物を蛋白質分解活性が欠失している上記ピキア (Pichia) 細胞中で発現させることを含んでいる。

本発明のさらには別の実施態様に従うと、オロチシン-5'一リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子（即ち、URA3 遺伝子）の組換えDNA断片が提供される。

本発明のさらには別の実施態様に従うと、組換えDNA作製物を形質転換できる宿主としてのピキア (Pichia) 属の酵母細胞が提供される（前記宿主はオロチシン-5'一リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子が欠失している）。

本明細書で使用される術語“蛋白質分解活性”とは、蛋白質分解経路に含まれる酵素により示される1つまたはそれ以上の酵素活性を表わしている。蛋白質分解活性には、プロティナーゼA活性、プロティナーゼB活性、カルボキシペプチダーゼY活性、カルボキシペプチダーゼS活性、アミノペプチダーゼC活性、ジ

る。この遺伝子の有効性は、ピキア (Pichia) の株 (Ura+) と組合させて、蛋白質分解活性が欠損したピキア (Pichia) の組換え株の産生に使用するための選択系が提供されることである。そのような Ura+ 株はまた、種々の異種生成物の組換え表現に使用される組換えDNA作製物による形質転換の宿主としても有用である。

### 図面の簡単な説明

図1はピキア (Pichia) のカルボキシペプチダーゼY活性に影響するピキア パストリス (Pichia pastoris) 遺伝子の制限地図である。図2はプラスミドpEP202の制限地図である。

図3はプラスミドpEP205の制限地図である。

図4はプラスミドpEP301の制限地図である。

図5はプラスミドpDR401の制限地図である。

図6はプラスミドpPU201の制限地図である。

図7はプラスミドpPU202の制限地図である。

図8はプラスミドpPU203の制限地図である。

図9はプラスミドpPU205の制限地図である。

図10はプラスミドpPU206の制限地図である。

図11はプラスミドpDR421の制限地図である。

図12はピキア パストリス (Pichia pastoris) オロチシン-5'一リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子（即ち、URA3 遺伝子）の制限地図である。

図13はpDR601およびpDR602の作製に使用された工程を要約している。

図14はプラスミドpDR601の制限地図である。

図15はプラスミドpDR602の制限地図である。

図16はプラスミドpDL521の制限地図である。

図17はピキア パストリス (Pichia pastoris) プロティナーゼBの遺伝子の一部の制限地図である。

図18はプラスミドpDR911の制限地図である。

ペプチジルアミノペプチダーゼ活性、プロティナーゼD活性、プロティナーゼE活性などが含まれる。

本明細書で使用される場合、直接または間接的に酵母株の蛋白質分解活性に影響する蛋白質をコードしている遺伝子には、プロティナーゼをコードしている遺伝子またはプロティナーゼに作用する蛋白質をコードしている遺伝子が含まれる。ここに使用される場合、蛋白質に作用する蛋白質とは、プロティナーゼの活性を変化させるかまたは調節する蛋白質を表わしている。従って、例えば蛋白質分解活性に直接影響する蛋白質とはプロティナーゼをコードしている蛋白質であり、蛋白質分解活性に間接的に影響する蛋白質とは蛋白質分解プロセシングにより蛋白質を活性化するまたは活性を増加させる蛋白質である。サッカロマイセス ベレビジエ (Saccharomyces cerevisiae) プロティナーゼはサッカロマイセス セレビジエ (Saccharomyces cerevisiae) の蛋白質分解活性に直接および間接的に影響を与える蛋白質の例である。

本発明の一つの実施態様に従うと、直接または間接的にピキア (Pichia) 属の株のカルボキシペプチダーゼY活性に少くとも影響を及ぼす蛋白質をコードしているピキア (Pichia) 遺伝子がピキア (Pichia) 属の一つの種から単離され同定された。この遺伝子は以後便宜上、この遺伝子およびS. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子の間のいくつかの類似性の存在に基づき、ピキア (Pichia) PEP4遺伝子と称される。しかしながら、ピキア (Pichia) 遺伝子およびサッカロマイセス (Saccharomyces) 遺伝子のヌクレオチド配列は本質的には異なっていることを認識されない。ピキア (Pichia) PEP4遺伝子は図1に示した制限地図により特徴づけられる。この遺伝子をコードしている配列を含む断片は種々の材料から簡単な操作により容易に得ることができる。そのような材料の一つはプラスミドpEP202(図2参照)の約10.6Kbp EcoRI断片であり、もしくはプラスミドpEP301(図4参照)の約2.7Kbp EcoRI-SacI断片である。

プロティナーゼA遺伝子をコードしているDNAもまた提供される。本発明の

プロティナーゼA遺伝子は配列番号2に示したアミノ酸配列を参照することによりさらに特徴付けできる。配列番号2に示されたものと本質的に同一のアミノ酸配列をコードしている任意の該配列を持つDNA、または相同的遺伝子の破壊のために有用であるような十分な相同意を持つDNAも本発明の実施に使用できる。上記のアミノ酸配列をコードしている核酸の例は配列番号1に示されている。

ピキア (Pichia) 属の株の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響を及ぼす蛋白質をコードしているピキア (Pichia) 遺伝子は、遺伝子の機能的生成物を産生できないようになるため、または前記ピキア (Pichia) 株の蛋白質分解活性に影響を及ぼす遺伝子産物の能力を変化させるために種々の方法により修飾できる。当業者は上記遺伝子の修飾のために多くの方法があることを認めるであろう。例えば、遺伝子によりコードされている蛋白質のアミノ酸配列を修飾するためにコード配列に突然変異を起こすことができる。もしくは、コード配列の種々の部分を遺伝子から欠失させることができる。欠失は発現された生成物を非機能的にするだけで十分である（たとえまだそれが発現できても）。従って、たった一つのヌクレオチドが欠失されても、残りのコード配列を読み伸ばすことで、たとえ発現できても生成物の機能を失わせることができる。もちろん、より大なる欠失は本質的に修飾された生成物を発現するようにならぬ。およびそのような生成物は、無傷の遺伝子により産生される生成物と比較して非常に異なった蛋白質分解性を有しているであろう（もしかったとしても）。さらに別の方法としては、間接とする遺伝子の読み伸を破壊するようにコード配列内へ追加の配列を挿入でき、それにより、発現される生成物は劇的に変化され、または完全に発現されなくなるであろう。

ピキア (Pichia) 属の株の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響を及ぼす蛋白質をコードしているピキア (Pichia) 遺伝子の修飾に特に適合の良い方法は前記ピキア (Pichia) 遺伝子内へ独立発現性のマーカー遺伝子を挿入し、それによりピキア (Pichia) 遺伝子を破壊することである。そのような独立発現性マーカー遺伝子はピキア (Pichia) またはサッカロマイセス (Saccharomyces) HIS4遺伝子、ピキア (Pichia) またはサッカロマイセス (Saccharomyces) ARG4遺伝子、

ピキア (Pichia) またはサッカロマイセス (Saccharomyces) URA3 遺伝子などから選択できる。

蛋白質分解活性を欠く ピキア (Pichia) 株は種々の方法により調製できる。現在のところ好適な方法は、遺伝子宿主中、本発明の遺伝子（この遺伝子は修飾されていない形では ピキア (Pichia) 種の株の蛋白質分解活性に、直接または間接的に影響を及ぼす蛋白質をコードしている）を修飾することから成る。もしくは、宿主株に無作為的な（即ち非選択的）突然変異を起こさせ、蛋白質分解活性を欠く突然変異体を選択するためにスクリーニングを行う。

宿主中、本発明の遺伝子を修飾させることにより蛋白質分解活性欠失株が產生される場合、そのような修飾は例えば、蛋白質分解活性に影響する蛋白質をコードしている遺伝子（即ち標的遺伝子）の特定の座位での宿主のゲノム内の修飾遺伝子の部位特異的組込みに適した形質転換条件下で修飾遺伝子を導入することにより実施される。組込みは宿主の内在性遺伝子を置き換えるまたは修飾するであろう。酵母宿主の標的座位内の修飾遺伝子の導入に適合の良い方法は宿主内の天然の遺伝子の2つの別々の相異なる末端を持つ直鎖状DNA断片中に修飾遺伝子を包含させることである。こうすれば形質転換により、その発現生成物が蛋白質分解活性に影響を与える遺伝子の特定の部位で相異なる組換えを起こすように方向付けられるであろう。

蛋白質分解活性を欠く ピキア (Pichia) 株は上に記したような（即ち、その発現生成物が蛋白質分解活性に影響する遺伝子の特定の座位での部位特異的組込みにより、本発明の修飾遺伝子を適した宿主内へ導入し、それにより、すべてまたは一部の修飾遺伝子を内在性遺伝子のすべてまたは一部を置き換える）好適な方法で調製され、内在性遺伝子は破壊されているであろう。

ここで使用される場合、修飾遺伝子“破壊”とは機能性生成物が生じないか、または変化した構造を持つ生成物を用るように遺伝子を最終的に生じさせる標的座位の操作を意味している。従って、付加された配列の存在（例えば独立栄養性マーカーの導入または読み替のシフトを起こす配列の導入により）、標的遺伝子からのスクレオチドの消失（例えば消失により）、または標的遺伝子の他の突然変異により破壊をおこすことができる。蛋白質分解活性を欠く ピキア (Pichia)

ura3 株を調製する好適な方法では遺伝子付加、遺伝子置換またはここで“ポップーイン-ポップアウト”と称される付加および置換の組合せにより遺伝子破壊が達成される。遺伝子置換においては内在性標的遺伝子が標的座位から物理的に除去され、修飾遺伝子と置換される。このことは、標的遺伝子の5'および3'の各々の末端と相異なる末端を持つ直鎖状断片で宿主を形質転換することにより達成される。遺伝子付加では内在性標的遺伝子へ形質転換DNAが付加される。形質転換DNAの修飾遺伝子が変形される方法に依存して、遺伝子付加により標的遺伝子の二つの非標的コピーやまたは標的遺伝子の一つの機能的および一つの非機能的コピーやが生じる可能性がある。二つのコピーの各々が内在性遺伝子の一部および形質転換DNAの一部から成り立っている。もし、遺伝子付加後に標的遺伝子の一つの機能性コピーが残っていたら、統いての標的遺伝子の二つのコピー間による相異なる組換えによりそれを除去することができる。相異なる組換えへと続く遺伝子付加の組合せ過程はポップーイン-ポップアウト過程である。

ピキア (Pichia) 種の酵母を形質転換する方法ならびにそのような酵母細胞の培養に適用できる方法は本分野では一般的なことである。上記の修飾遺伝子を含む構成物は、Cregg et al., Mol. Cell. Biol. 5: 376 (1985) および米国特許第4, 879, 231号により記載されているスフェロプラスト技術またはピキア (Pichia) に適応させるために審査された【欧州特許出願第312, 934号参照：米国特許第4, 929, 535号も利用できる】全細胞培養リチウム酵母形質転換系【Ito et al., Agric. Biol. Chem. 48: 341 (1984)】によりピキア (Pichia) 細胞を形質転換する。スフェロプラストの発現および維持を必要としないので、しばしば全細胞培養リチウム法が便利である。スフェロプラスト法は一般的に形質転換の効率がより良い手段であるので、本発明の目的にはスフェロプラスト法が好適である。

上記の修飾遺伝子により形質転換される宿主 ピキア (Pichia) 株は野生型 ピキア (Pichia) 様であり、蛋白質分解経路の欠失遺伝子による形質転換により、減少した蛋白質分解活性でスクリーニングできることを当筆者は認識するであろう。用いられる宿主株は所望の形質転換体の同定および選択を助け

るために一つまたはそれ以上の欠損を持つことができる。

ピキア (Pichia) 株の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響する蛋白質をコードしている遺伝子の修飾形での形質転換に使用される好適な宿主は、少くとも一つの独立栄養性マーカー遺伝子が欠失した株である。そのような宿主を本発明の修飾形および独立栄養性マーカー遺伝子で両端形質転換することにより形質転換DNAが取り込まれた（従って宿主の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響する蛋白質をコードしている遺伝子の破壊形を持っているはずである）株の迅速な選択が可能になるため、前記の宿主生物の使用が好適である。

本発明の実施に有用な独立栄養性マーカー遺伝子の例としては（即ち、使用される好適な宿主株に欠損しているマーカー遺伝子）ヒスチジノール・デヒドロゲナーゼ遺伝子、アルギニノスクシネット・リヤーゼ遺伝子、またはオロチシン-5'-リリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子などが挙げられる。そのような宿主株が ピキア (Pichia) の形質転換に用いられた場合、上記の修飾遺伝子（直鎖状DNA断片に含まれている）は、好適には宿主株が欠失している独立栄養性マーカー遺伝子の無傷の形と会合する（例えば独立栄養性マーカー遺伝子の各々は修飾遺伝子内に含まれているかまたは形質転換用直鎖状DNA断片上の修飾遺伝子の5'または3'に位置している）。本発明の実施での使用が企図されている宿主株の例としては、HIS-4欠失 ピキア (Pichia) 株、GS115 (ATCC 20864)、ARG-4欠失 ピキア (Pichia) 株、GS1 90、HIS-4/URA3欠失 ピキア (Pichia) 株、GS4-2、HIS-4/ARG-4欠失 ピキア (Pichia) 株 PPF1 (NRRL Y-18017; 米国特許第4, 812, 405号参照) などが挙げられる。ヒスチジノール・デヒドロゲナーゼをコードしている機能性遺伝子が導入されている上記修飾遺伝子を含むDNA断片は、例えば、プラスミド pDR401 の約5.3Kbp SacI-EcoR [断片から導くことができる。上記遺伝子の修飾形を含むDNA断片（オロチシン-5'-リリン酸デカルボキシラーゼをコードしている機能性遺伝子の5'に位置している）の別の断片は、例えば、プラスミド pDR421 の約5.0 Kbp Bgl I [断片から導くことができる。

蛋白質分解活性を欠く ピキア (Pichia) 株の特に都合のよい応用例は、

例えば表皮増殖因子 (EGF)、成長ホルモン放出因子 (GRF)、インシクリン増殖因子-1 (IGF-1) などの蛋白質分解感受性組換え生成物の発現である。蛋白質分解活性を欠く組換え ピキア (Pichia) 株で発現された場合、宿主生物の蛋白質分解装置が修飾されているため、生じる組換え生成物のうける蛋白質分解活性のレベルは低い。

蛋白質分解感受性生成物產生のための蛋白質分解欠失 ピキア (Pichia) 発現系は種々の方法により作ることができる。例えば ピキア (Pichia) 宿主株は上記のごとく蛋白質分解欠損に亘り、次にさらに問題とする異種蛋白質（特に蛋白質分解感受性蛋白質）をコードしているDNAで形質転換される。もしくは、問題とする異種蛋白質をコードしているDNAをすでに有する (beating) 組み換え ピキア (Pichia) 株を後から例えば上記のように蛋白質分解を欠失させるようにできる。さらに別の例では、ピキア (Pichia) 株は上記の修飾遺伝子および問題とする異種の蛋白質分解感受性蛋白質をコードしているDNAで同時形質転換できた。

ペプチド生成物の組換え発現においての宿主株としての ピキア (Pichia) 種の株の使用は以前に非常に詳細に記述されている。本発明の実施における使用のために現在のところ好適な酵母種は、唯一の炭素源およびエネルギー源としてメタノールを効率よく利用できる既知の工業的酵母種の ピキア (Pichia pastoris) (P. pastoris) である。

メタロトローフ酵母には多数のメタノール応答性遺伝子があり、各々の発現はメタノール応答性制御領域（プロモーターとも称される）により制御されている。そのようなメタノール応答性プロモーターは本発明の実施においての使用にも適している。特別の制御領域の例としては、ピキア (Pichia pastoris) AOX1 からのプライマリー・アルコールオキシダーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. pastoris (P. pastoris) AOX2 (P. pastoris (P. pastoris) AOX1) は二つの機能的なアルコールオキシダーゼ遺伝子を含んでいることが知られている：アルコール・オキシダーゼ I (AOX1) やアルコール・オキシダーゼ II (AOX2)；二つのAOX遺伝子のコード部分はDNAおよび予測されるアミノ酸配列の両方のレベルで非常に相同であ

特表平6-506117 (8)

り、共通の制限部位を共有している：二つの遺伝子から発現される蛋白質は類似の酵素性質を持っているが AOX1 のプロモーターはより効率的であり、その遺伝子産物はしばしばより多く発現される】からのセカンダリー アルコール オキシダーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (pastoris) からのジヒドロキシアセトン シンターゼ遺伝子 (DAS) のためのプロモーター、P. パストリス (pastoris) からのP 40 遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (pastoris) からのカタラーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (pastoris) からのアルデヒド デヒドロゲナーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (pastoris) からの葉酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のためのプロモーターなどが挙げられる。

現在のところ、P. パストリス (pastoris) 宿主において、蛋白質分解感受性生成物をコードする遺伝子の発現の制御のための好適なプロモーター領域は P. パストリス (pastoris) のメタノール耐性プロモーター アルコール オキシダーゼ遺伝子のプロモーターである。プロモーターを含む AOX1 遺伝子は単離され、十分に特徴付けられている；Elliis et al., Mol. Cell. Biol., 5: 1111 (1985) および米国特許第4, 855, 231 参照。

組み換えた蛋白質発現株の発生のためにピキア (Pichia) 細胞の形質転換に使用される現在好適な発現カセットは、転写の読み方の方向に、以下のDNA配列を含んでいる：

- (I) メチロトローフ酵母のメタノール応答性遺伝子のプロモーター領域；
- (II) (a) 隨意の分泌シグナル配列、および
- (b) 問題とする異種蛋白質

から本質的になるポリペプチドをコードしているDNA配列；および  
 (当) メチロトローフ酵母中の機能的な転写ターミネーター；  
 ここで前記DNA配列は、前記ポリペプチドをコードしている配列の転写のため機能的に作用するようにお互いに間連している。本発明の実施に使用される発現ベクターに隨意に含まれている分泌シグナル配列をコードしているDNA配列には、蛋白質分解感受性生成物に関連した天然の分泌シグナル配列をコードしてい

が通常用である：しかしながら、効率を上げるには相間性の程度を最大にするのが好適である。

蛋白質分解感受性生成物の組換え発現の宿主の形質転換に本発明に従って使用されるDNA構成物は隨意に一つまたはそれ以上の発現カセットに加えて選択可能マーカー遺伝子をさらに含んでいる。この目的には、メチロトローフ酵母中で機能的に作動する任意の選択可能マーカー遺伝子が用いられる、即ち、メチロトローフ酵母細胞に表現型を与える、それにより大多数の非形質転換細胞の中でも同定が可能になり、および選択的に増殖する。選した選択可能マーカー遺伝子には、例えば、独立変異性突然変異体 P. パストリス (pastoris) 株の形質転換に S. セレビジエ (cerevisiae) または P. パストリス (pastoris) H1S4 遺伝子が用いられるであろうし、ARG4 突然変異体 P. パストリス (pastoris) 株の形質転換には S. セレビジエ (cerevisiae) ARG4 遺伝子または P. パストリス (pastoris) ARG4 遺伝子が用いられるであろうし、URA3 突然変異体 P. パストリス (pastoris) 株の形質転換には、S. セレビジエ (cerevisiae) URA3 遺伝子または P. パストリス (pastoris) URA3 遺伝子が用いられるであろう。

さらに、本発明のこの態様に従った蛋白質分解感受性生成物の組換え発現の宿主の形質転換に使用されるDNA構成物は、隨意に細胞中で機能的に作動する選択可能マーカー遺伝子をさらに含んでいる。従って、大多数の非形質転換細胞の中から同定されおよび選択的に増殖するように粗面細胞を形質転換することを可能にする細面表現型を与える任意の遺伝子が使用できる。この追加の選択可能マーカーは本発明のDNAの増殖のため大細胞のような細胞内への形質転換を可能にする。選した選択可能マーカーにはアンビシリントリオニン耐性遺伝子 (Amp') 、チトラサイクリン耐性遺伝子 (Tc') などが含まれる。

本発明のDNAが細胞細胞でも適用するように意図された場合、細胞の世代から世代へ本発明のDNAが維持されるのを確実にするため、DNA構成物中に細

るDNA、S. セレビジエ (cerevisiae) α-摺合因子 (αMF) リガード配列をコードしているDNA（プロセシング部位をコードしているDNA配列を含む、lys-arg）、およびウシ リゾチームC シグナル配列のようなメチロトローフ酵母細胞で機能するシグナル配列を含んでいる。

本発明に従って使用されるメチロトローフ酵母で機能する転写ターミネーターは (a) 転写体中でポリアデニル化信号およびポリアデニル化部位を提供するサブセグメントおよび/または (b) 発現カセットで使用されるプロモーターからの転写の転写終結信号を提供するサブセグメントを待っている。ここで使用される術語“発現カセット”とは本明細書および請求の範囲を通して、発現過程に機能的に作用する配列を含むDNA配列を意味している。全転写ターミネーターは蛋白コード化遺伝子からとられ、それはプロモーター源の遺伝子と同じでも異なっていてもよい。

蛋白質分解感受性生成物の組換え発現のための宿主の形質転換に使用される本発明のDNA構成物中、発現カセットのセグメントはお互いに“接続するように間連して”いるであろう。蛋白質分解感受性生成物をコードしているDNA配列はプロモーター、分泌シグナル配列（もし用いられるなら）および転写ターミネーターに関して機能的に作動するように位置し向されている。従って、プロモーター領域の制御下、ポリペプチドをコードするセグメントは、翻訳により所要のポリペプチドを提供できる転写体内へ転写される。適切な読み方の位置決定および発現カセットの種々のセグメントの配向は当業者には周知のことである；より詳細には説明は実施例に与えである。

本発明の実施には、蛋白質分解感受性生成物の組換え発現のための宿主は、一つのDNA断片に含まれている上記発現カセットの多数のコピーで（好適には先端-末端で配向している）形質転換されるのが好適である。

さらに、本発明に従ったDNA構成物が部位特異的組込みによる蛋白質分解感受性生成物の組換え発現の宿主の形質転換に使用された場合、構成物を含む発現カセットは直鎖状DNA断片（その中のDNA断片の組込みに有効なように宿主の所要の座席へ配向する）である。もし、導入されるべきDNAが標的遺伝子の断片座席と0.2 kbほどの相容性しか持っていないなら、一工程遺伝子組込み

の複製起点を包含させる事が望ましい。細菌の複製起点の例としては f 1-o<sup>r</sup>i、コリシン、Coi E1 などが含まれる。

ここで使用される術語“発現ベクター”には、その中に含まれているDNA配列を発現できるベクターを含んでいるつもりであり、そのような配列はその発現が有効なように他の配列と（即ち、プロモーター配列）機能的に作動するような関係にある。一般には、組換えDNA技術で通常使用される発現ベクターはしばしば“プラスミド”的である（即ち、環状、二本鎖DNAループ、そのベクター一形では染色体に結合しない）。本明細書においては術語“ベクター”および“プラスミド”は互換的に使用されている。しかしながら、本発明には機能的に均等な他の形の発現ベクターも同様に含まれるつもりである。

ピキア (Pichia) 細胞の株種を形質転換する方法、ならびに、そのような酵母細胞の培養に応用できる方法は一般的には本分野では既知である。

本発明に従うと、上記の複数遺伝子および/または異種の蛋白質分解感受性生成物をコードしている発現カセットを含む構成物は上記のように、スフェロプラスト技術または全細胞培養リチウム酵母形質転換系によりピキア (Pichia) 細胞内へ移される。

所望の表現型および遺伝子型である形質転換された株はバッチまたは連続モードで発酵槽で増殖される。メチロトローフ酵母中の組換えDNAに基づく生成物の大規模生産には、三段階、高細胞密度発酵系が現在広泛な発酵プロトコールとして用いられている。最初の段階（または増殖段階）では、発現宿主は非誘導炭素源（例えばグリセロール）を過剰に含む履定量小培地中で培養される。そのような炭素源での増殖では異種遺伝子表現は完全に抑制され、異種蛋白質を発現しない細胞塊の発生が可能である。この増殖段階の間、P. パストリス (pastoris) 細胞は一般にその最適な増殖に約5のpHを好んでいるので、培地のpHを約5に維持することが現在のところ好適である。次に、さらに細胞塊を増加させ、メタノール応答性プロモーターを抑制するため、短い期間、非誘導性炭素源制限増殖を行う。この制限増殖期間の培地のpHは適切なpH値に維持される（使用される実際のpHは発現に使用された特定の宿主株および発現される生成物に依存する）。

特表平6-506117 (7)

制限条件下での増殖期間に統一して、プロスからの生成物の同時除去による連続式法; またはプロスのメタノール含量が低レベルに維持されるバッテ方法(ここでは“メタノール過剰供給バッテモード”と称される)により発酵槽にメタノールが添加される。メタノールの添加はメタノール応答性プロモーターにより制御されている遺伝子の発現を誘導する。この第3段階は、この段階で大多数の組換え生成物が発現されるので生産段階と称される。生産段階の培地のpHは適切なpH値に維持される(用いられる実際のpHは発現に使用される特定の宿主および発現される特定の生成物に依存する)。

宿場“培養”とは細胞増殖の助けとなる培地中での細胞の増殖、およびそのすべての代謝増殖を意味している。宿場“純代培養”とは別の培養の増殖細胞(純培養)の細胞増殖、または問題とする純代培養および原培養間で実施された純代培養工程の数とは無関係に、純培養の任意の純代培養を意味している。

本発明の好適な実施態様に従うと、蛋白質分解感受性生成物の產生に使用される異種蛋白質発現系は、非常に効率が高く堅密に制御されるP<sub>r</sub>、パストリス(pastoris)のメタノール制御AOX1遺伝子から誘導されたプロモーターが利用される。この遺伝子は同様に転写ターミネーター領域でもあります。現在好適な発現カセットは、お互いに機能的に作動するP<sub>r</sub>、パストリス(pastoris) AOX1プロモーター、隨意の分泌シグナル配列をコードしているDNA、蛋白質分解感受性生成物(例えば成熟IGF-1、EGF、GRPなど)をコードしているDNAア配列、およびP<sub>r</sub>、パストリス(pastoris) AOX1遺伝子から誘導された転写ターミネーターを含んでいる。好適には一つの接接着DNA断片上の複数の発現カセットを得るため、一つのDNA断片上に、先端一末端の配向で二つまたはそれ以上のそのような発現カセットが含まれている。

多発現カセットで形質転換されるべき好適な宿主細胞は現在のところ、形質転換DNA断片上に存在するマークー遺伝子で構成できる少くとも一つの突然変異を持つP<sub>r</sub>、パストリス(pastoris)細胞である。好適にはHIS4<sup>-</sup>(GS115)またはARG4<sup>-</sup>(GS190)單一独立栄養性突然変異体P<sub>r</sub>、パストリス(pastoris)株が用いられるが、HIS4<sup>-</sup>/URA3<sup>-</sup>(GS4-2)またはHIS4<sup>-</sup>/ARG4<sup>-</sup>(PPFL)二重独立栄養性突然変異体P<sub>r</sub>、パストリス(pastoris)株も用いられる。

遺伝子破壊技術を使用する。最初に、形質転換体はURA3のようなマークー遺伝子を含む破壊ベクターの取り込みにより選択される(即ち、“ポップーイン”工程)。次に、選択された形質転換体は内在性遺伝子ア配列および組込まれたベクター配列間で組換えが起こり、それによりマークー遺伝子を含むベクターの一部および宿主の内在性ア配列が切り出された株を同定するためにスクリーニングされなければならない(即ち、“ポップーアウト”工程)。URA3遺伝子およびURA3宿主に基づく二重選択系で所望の株の同定が行われる。

この型の遺伝子破壊は典型的には、5-フルオロオロチニン酸(5-FOA)耐性により同定できるUra<sup>r</sup>株で実施される。破壊されるべき標的の遺伝子の欠失コピーおよび機能的URA3遺伝子を破壊ベクターは含んでいる。Ura<sup>r</sup>宿主細胞のゲノムへの破壊ベクターの組込みは、一つの機能的標的の遺伝子および一つの非機能的(即ち、破壊された)標的の遺伝子を含むUra<sup>r</sup>形質転換体を発生させる。Ura<sup>r</sup>形質転換体はウラシル非存在下で増殖できるその能力により、容易に同定される。

組換えにより、欠失遺伝子のみを残して機能的標的の遺伝子が除去された株を単離するため、組換えに伴うURA3遺伝子の消失(“ポップーアウト”)により生じた5-FOA耐性の復元でUra<sup>r</sup>形質転換体がスクリーンされた。URA3遺伝子型の再生はゲノム中の他の遺伝子の統合によって破壊のための“ポップーイン-ポップーアウト”過程の繰り返しを可能にする。蛋白質分解活性を欠くピキア(Pichia)株の発生にこの選択系を使用するためには、ピキア(Pichia)蛋白質分解経路に含まれる蛋白質をコードする遺伝子の修飾形およびURA3遺伝子を含むDNA構成物でURA3宿主が形質転換される。遺伝子付加による形質転換DNAの部位特異的組込みにより(即ち、“ポップーイン”)、蛋白質分解活性に直接または間接的に影響を及ぼす遺伝子の座位に一つの機能的および一つの非機能的な遺伝子ならびに無害のURA3遺伝子を得る。URA3遺伝子を取り込んだ株は陽性選択により同定される(当業者にはよく知られている技術を用いて、例えばウラシルを欠く最小培地上で株を増殖させ、そのような培地上で増殖できる株を選択することにより)。蛋白質分解活性に影響する蛋白質をコードしている遺伝子の座位での機能的、非機能的およびURA3遺伝子の

パストリス(pastoris)株も用いられる。

一つまたはそれ以上の発現カセットを含む断片は宿主の代謝欠陥を補足するマークー遺伝子および宿主に細胞マーカー遺伝子、ベクター組込みを方向付ける静止DNA配列などを含むプラスミド内へ挿入される。

本発明の特徴の実施態様に従うと、オロチジン-5'一リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を含むピキア(Pichia)属の種から得られる單離DNA断片が提供される。オロチジン-5'一リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子はしばしばUR<sub>A</sub>3と称される。例えばそれはUR<sub>A</sub>3欠失株の補足に使用できる。ピキア(Pichia)ゲノムの特徴の座位を(即ち、URA3座位への)DNAの目標とさせる能力が本新規遺伝子の別の使用法である。この新規遺伝子は図12に示した制限地図を参照して特徴付けできる。もしくはこの新規遺伝子は配列番号4に示したものと同一アミノ酸配列を実質的に持つ蛋白質をコードしていると特徴付けできる。当業者は上記のアミノ酸配列は種々のヌクレオチド配列によりコードできることを認識しているであろうが、上記のアミノ酸配列をコードしている肝運送ヌクレオチド配列は配列番号3に示された配列と実質的に同一である。

本発明の別の特徴の実施態様に従うと、組換えDNA物質で形質転換できる宿主として(宿主はオロチジン-5'一リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子欠失している)ピキア(Pichia)属の酵母細胞が提供される。UR<sub>A</sub>3が欠失した宿主株は、無害の形のUR<sub>A</sub>3遺伝子を含むDNAによる形質転換に使用でき、それにより所望の形質転換が起きたかどうかを容易に決定できる(形質転換が成功した細胞ではウラシル原発性が戻ることにより)。

UR<sub>A</sub>3ピキア(Pichia)株とピキア(Pichia)オロチジン-5'一リン酸デカルボキシラーゼマークー遺伝子の組み合わせは、蛋白質分解活性を欠くピキア(Pichia)の組換え株の產生に使用するため特に有用な選択系を提供する。そのような選択系はここでは“二方向性選択法”と称される。蛋白質分解活性を欠くピキア(Pichia)の発生のためのこの選択系は、欠失遺伝子を含むDNA断片が宿主生物のゲノムへ付加され、就いて内在性の遺伝子配列および組み込まれたベクター配列間の相間的組換えにより宿主からDNA断片の一部および内在性配列を除去する“ポップーイン-ポップーアウト”

コンフィギュレーションにより、機能的および非機能的遺伝子の一つおよびUR<sub>A</sub>3遺伝子の喪失を生じる機能的および非機能的遺伝子間の組換えが可能になる(即ち“ポップーアウト”)。

その後、細胞をウラシル経路中間体の非毒性類似体である5-フルオロオロチニン酸(5-FOA)(UR<sub>A</sub>3株により代謝された場合、細胞にとって毒性のある化合物を產生する)を含む培地上に播種することにより、機能的UR<sub>A</sub>3遺伝子を欠く株が陽性選択できる。なぜならUR<sub>A</sub>3株はウラシル経路の特定の点が阻害されているので5-FOAを代謝せず、その毒性効果を受けない(従って“5-FOA耐性”と称することができる)。対照的にUR<sub>A</sub>3株は5-FOAを代謝して毒性化合物を產生し、それがUR<sub>A</sub>3細胞の増殖を妨げる。得られるUR<sub>A</sub>3細胞は機能的標的の遺伝子も欠いており、蛋白質分解活性が欠失されている。UR<sub>A</sub>3表現型は復元されるので、得られる細胞は選択可能マークーとしてUR<sub>A</sub>3を再び用いて形質転換できる。

ウラシル経路中間体の毒性類似物を用いて、機能的UR<sub>A</sub>3遺伝子を欠く株を陽性選択できるため、これをピキア(Pichia)宿主に複数の表現型変化を与える非常に都合の良い“ポップーアウト”法として使用できる。

同じ種の野生型株中に存在する蛋白質分解活性と比較して蛋白質分解活性が欠失しているUR<sub>A</sub>3ピキア(Pichia)株は天然形のUR<sub>A</sub>3遺伝子および蛋白質分解感受性生成物を含む発現ベクター(両方とも同一のベクターの一部として、または宿主内へ形質転換される第二のベクターとして)での形質転換に特に有用である。ウラシル原発性が復元されたこれらの形質転換体は(簡単なスクリーニング法により容易に決定できる)、それらの中に蛋白質分解感受性生成物をコードしている遺伝子を取り込んでいるはずであり、従って生成物発現に直接利用できるであろう。

本発明はここで以下の実施例を参照しながらより詳細に説明されるが、以下の実施例に制限されるわけではない。

実施例

実施例1:P<sub>r</sub>、パストリス(pastoris) PEP4遺伝子の導入

P<sub>r</sub>、パストリス(pastoris) PEP4遺伝子は、相同的なサックロマ

## 特表平6-506117 (8)

イセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) PEP4 遺伝子の放射性標識断片とハイブリダイズするその能力を利用してバクテリオファージ ラムダからのEMBL3P. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNAライプラリーから同定された。ハイブリダイズした組換えDNAを含む陽性ブラークを単離することによりP. パストリス (*pastoris*) PEP4 遺伝子がクローニングされた。

A. P. パストリス (*pastoris*) EMBL3ゲノムDNAライプラリーの作製

バクテリオファージ λがP. パストリス (*pastoris*) PEP4 遺伝子のクローニングのための運搬体として使用された。P. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNAのSau3A部分消化の断片が細胞宿主中の組換えDNAの増殖に必須のバクテリオファージ λゲノムの要素を含んでいるバクテリオファージ λベクターEMBL3 [Frischauf, A. - M. et al. (1983). J. Mol. Biol. 170: 827] 内へ挿入された。P. パストリス (*pastoris*) DNA含有EMBL3ベクターはインピロで感染性ビリオンへパッケージされバクテリオファージ λP. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNAライプラリーを得た。ライプラリーの増殖は組換えウイルスで感染させた大腸菌宿主細胞中の組換えDNAの増殖により達成された。ガラス棒巻き技術 [Cregg et al. Mol. Cell. Biol. 5: 3378-3385 (1985)] を用いて単離されたビキア パストリス (*Pichia pastoris*) ゲノムDNA (NRRL Y-11430 株、Northern Regional Research Center, Peoria, IL) は0.1 μg/μgの有効濃度で、37°Cにて7.14.21および28分のインキュベーションによるSau3Aの消化を実施した。各々のインキュベーション混合物の一部は消化されたDNA断片の大さきを決定するため1%アガロースゲル上、電気泳動により分離された。7および14分インキュベーションされた消化物は主として9-23 kb断片から成っていると思われた。これらの消化物をブールし、下記のように調製されたEMBL3ベクター アームへ連結した。

### リーニング

PEP4 遺伝子に対するビキア (*Pichia*) ゲノムを充分にスクリーンするため、50,000の組換えファージおよび大腸菌原生宿主株LE392 (Stratagene EMBL3クローニングキットで提供される) を4つの大きな150mmプレートに播種した。6-7時間増殖させた後、プレートを4°Cに冷やした。各々のプレートをマークし、各々のプレートのブラークリフトの複製は各々のプレート上にニトロセルロースを置くことにより調製した。フィルターを密閉させ、中和し、焼いて S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4 遺伝子 [Thomas Stevens, University of Oregon, Eugene, Oregon の研究室から入手した S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4 遺伝子を含む、ゲルで精製された S. セレビジエ (*cerevisiae*) DNAの<sup>32</sup>P標識4.0kb断片: Rothman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3248-3252 (1986) 参照] で検査された。ハイブリダイゼーションは30%ホルムアルデヒド、6×SSC、5×デンハート溶液、20mM トリス-HCl: pH8.0, 1mM EDTA, 0.1% SDS および100 μg/ml Iサケ精子DNAを含む溶液中、37°Cで実施された。ハイブリダイゼーション後、2×SSCおよび0.1%SDSを用い室温で3回フィルターを洗浄した。これらの最初の洗浄に続いて、2×SSCおよび0.1%SDSを用いて55°Cにて2回洗浄した。

S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4 遺伝子の断片にハイブリダイズするDNAを含む15の陽性ブラークがフィルターのオートラジオグラムから二通り (in duplicate) 同定された。15の陽性ブラークの各々の周りの領域を単離し、SM緩衝液中に置いた。単離物のうちの6つを10<sup>-3</sup>および10<sup>-2</sup>の希釈で大腸菌株LE392と共により小さな100mmプレートに播種した。第1のブラークスクリーニングで使用されたものと同一のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下、各々のプレートのシングル ブラークリフトが S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4 遺伝子断片で検査された。この2回目のスクリーニングにおいてオートラジオグラム上12の陽性ブラーク

EMBL3ベクター アームはベクター (EMBL3クローニングキット, Stratagene Cloning Systems, San Diego, CAから得られた: カタログ番号 241211) のBamHIおよびEcoRIによる二重消化により調製された。スクレア断片からアームを分離している小さなBamHI/EcoRIリンクーはエタノールによる選択的沈殿により消化物から除去された。1 μgのEMBL3前消化アームへのSau3A消化ビキア (*Pichia*) ゲノムDNA (0.5 μg) の結合は5 μlの反応混合物の4°C、2日間のインキュベーションにより達成された。

P. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNA断片およびEMBL3ベクター アームの結合により調製された組換えバクテリオファージλDNAはインピロで市販のパッケージング抽出物 (Stratagene EMBL3クローニングキット) を用いてパッケージングされた。EMBL3に基づくP. パストリス (*pastoris*) ゲノムライプラリーは組換えファージをプロファージP2を含む大腸菌原生宿主株P2-392 (Stratagene EMBL3クローニングキットで提供されている) とともに培養することにより増幅された。野生型バクテリオファージは大腸菌株P2-392中では増幅しない。P2感受性を与える野生型遺伝子の二つを欠く組換えEMBL-3によるバクテリオファージはこのP2含有大腸菌株中でよく増幅できる。増幅において、宿主株として大腸菌P2-392を使用すれば、細胞宿主中組換えファージのみが増幅することが保証される。

EMBL3に基づくP. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNAのすべてのプレートにSM緩衝液 (5.8g NaCl, 2g MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 50ml 1Mトリス-HCl, pH7.5、および5ml 2%ゼラチンを1リットルに含む) を播種した。5時間後、上澄み液を集めてブールし、説明書に従って力価およびゲノム当量を計算した。このライプラリーは約10ゲノム当量を含んでおり、その力価は6×10<sup>11</sup> プラーク形成単位/ml (pfu/ml) であった。

B. プローブとして S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4 遺伝子を用いるEMBL3 P. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNAのスク

が検出された。これらのシングルブラークの9つが単離され、SM緩衝液中に置かれた。これらの9つのブラークの各々が10<sup>-3</sup>および10<sup>-2</sup>の希釈で大腸菌株LE392と共に小さな100mmプレートに播種された。再び、最初の2回のスクリーニングで使用したものと同一のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下、S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4 遺伝子断片で各々のプレートのシングル ブラークリフトが検査された。各々のプレートはプレートに均等に分布する約10-20のブラークを含んでいた。フィルターのオートラジオグラムにより各々のプレート上のすべてのブラークが PEP4 プローブにハイブリダイズしたこと明らかにされた。

異なったプレートから5つの別々のブラークを単離し、SM緩衝液中に置いた。これらの単離物の3つ (各々4721, 5111および5131と称される) の大規模培養からDNAが、組換えファージに含まれている PEP4 遺伝子の同定、特徴付けおよびサブクローニングのためにバクテリオファージ単離の調導法 [Maniatis, T., Fritsch, E. F. およびSambrook, J., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA (1982)] を用いて調製された。

C. S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4 遺伝子にハイブリダイズしたEMBL3P. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNAライプラリーの单離物中の特徴付け

EMBL3ビキア (*Pichia*) ゲノムDNAライプラリーからの3つの单離物 (4721, 5111および5131、上記参照) から調製された組換えファージDNAは種々の制限エンドヌクレアーゼで消化され、0.8%アガロースゲル上で分離され、エチジウムブロミド染色により可視化された。さらに、これらの消化物の1 μlが第2のアガロースゲル上で分離され、ニトロセルロース上にプロットされ放射性標識 S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4 遺伝子の断片で検査された。30%ホルムアルデヒド、6×SSC、5×デンハート溶液、20mMトリス-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 0.1%SDS

## 特表平6-506117 (9)

Sおよび100 μg/ml サケ精子DNAを含む溶液中で、37°Cでハイブリダイゼーションが実施された。続いてフィルターは2×SSCおよび0.1%SDSを用いて室温で5分間3回、続いて2×SSCおよび0.1%SDSを用いて5°Cで5分間2回洗浄した。

2つのクローン(5111および5131)からのDNAの同じ消化物がエチジウムプロミド染色により決定され、同じパターンの制限酵素断片が得られたが、第3のクローン(4721)からのDNAの同じ消化物からは異なった断片パターンが得られた。S. cerevisiae (cerevisiae) PEP4遺伝子断片に対するサザンプロットハイブリダイゼーションにより各々のクローンからのDNAの制限酵素断片の分析により、クローンの2つの組の両方とも同じ大きさの一連のハイブリダイズする断片を含んでいることが明らかにされクローンの二つの組はプローブハイブリダイズした共通の異なったDNA配列を持っていることが示された。

D. クローン化P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子のサブクリーニングおよび特徴づけ

プローブとして相同的なS. cerevisiae (cerevisiae) PEP4遺伝子を用いるEcoRI消化P. パストリス (pastoris)ゲノムDNAのサザンプロットハイブリダイゼーションにより決定されたごとく、P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子はP. パストリス (pastoris)ゲノムの10.6 kb EcoRI断片内に含まれている。実験例1に記載したごとくクローン4721のEcoRI消化DNAのサザンプロットハイブリダイゼーションは、それがS. cerevisiae (cerevisiae) PEP4遺伝子へハイブリダイズした10.6 kb断片を含んでいることを明らかにした。クローン化P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子の操作を容易にするために、単離4721からのDNAのEcoRI断片上に含まれるP. パストリス (pastoris) ベクターゲノムDNAがpUC19内へサブクリーニングされた。クローン4721(25 μg)が300 μlの純度中、EcoRI(60単位)にて消化された。消化DNAは0.65%アガロースゲル上で分離され、DE81ペーパーで10.6 kb EcoRI断片が単離された。精製断

片は400 μlの1M NaClでペーパーから洗い出され、フェノール／クロロホルムで抽出された。DNAは次にエタノールで沈殿され、10 μlの純度で水に再懸濁された。約50 ngの10.6 kb断片はEcoRIで切断され、脱リン酸化されている等量のpUC19に連結された。連結混合物は大腸菌株MC1061の形質転換に使用された。アンビシン耐性コロニーが選択され、断片10.6 kb EcoRI断片の存在をコロニーDNAの制限酵素消化物の分析によりスクリーニングした。大腸菌プラスミド調製物は正しいプラスミド(pEP202と名付けられた)を含むコロニーから作製された。プラスミドpEP202は完全P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子を含んでいる(図2参照)。

クローン化P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子の配列分析を容易にするために、P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子の一部がpUC19内へサブクリーニングされた。プラスミドpEP202はBamHIおよびEcoRIで消化された。反応混合物は0.7%アガロースゲル上で分離され、DNAの0.45 kb BamHI断片(図2参照)がDE81ペーパーを用いて単離された。精製断片はBamHIによる消化により直鎖状化され、脱リン酸化されているpUC19(~20 ng)と連結された。連結混合物は大腸菌株MC1061の形質転換に使用された。形質転換体はアンビシン耐性で選択され、シングルBamHI断片の存在をコロニーDNAの制限酵素消化物の分析でスクリーニングした。この形質転換から生じるシングルコロニーは適切なDNA構成物を含んでいることが証明され、pEP205と名付けられた(図3参照)。

プラスミドpEP202の配列分析でS. cerevisiae (cerevisiae) PEP4遺伝子と~70%の相同性を持つDNA配列と同定された。pEP202のこの配列によりコードされているアミノ酸配列はS. cerevisiae (cerevisiae) PEP4遺伝子によりコードされている配列と69%相同的である。

実験例11: P. パストリス (pastoris) の PEP4 欠失 (PEP4-) 株の開発

A. P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子破壊ベクター pDR

### 4.01の作製

P. パストリス (pastoris) の PEP4欠失 (PEP4-) 株の開発に使用するためベクター-pDR401が作製された。このベクターは、P. パストリス (pastoris) の PEP4株の形質転換に使用された場合、野生型PEP4遺伝子の置換による宿主ゲノム内へ組込まれる、欠陥のあるP. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子を含んでいる。

pDR401は以下のごとく2工程法で作製された。第1の工程では、pEP202からpDR401作製における基盤ベクター(基盤ベクター-pEP301)が作製された。ベクター-pEP301はpUC19配列およびpEP202からのクローン化P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子を含んでいる。プラスミドpEP202(15 μg)はSacIで消化された。5.5 kb SacI断片(SacIリンカーから時計回りに5箇のSacI部位まで広がった断片、およびすべてのpUC19配列およびPEP4遺伝子を含んでいる(図2参照))がDE81ペーパーを用いて0.7%アガロースゲルから単離された。断片は400 μlの1M NaClでペーパーから溶出され、400 μlのフェノール／クロロホルムで抽出され、エタノールで沈殿された。このDNAは1 μlのリガーゼおよび水を含む純度で10 μlの培液中で連結させることにより5.5 kb HIS4含有断片がpEP301内へ挿入された。結合は直温で3時間実施され、連結混合物はMC1061細胞の形質転換に使用された。アンビシン耐性コロニーから調製されたプラスミドDNAはBglII, SalI, BglII/SalI, BglII/SalI, Pvul, NcoIおよびKpnIで消化され、pDR401の作製が確認された。制限断片パターンは正しいプラスミドpDR401に期待されるものと一致した(図5参照)。プラスミドpDR401はP. EP4構造遺伝子内の特異的BglII部位にP. パストリス (pastoris) HIS4遺伝子が挿入されたpUC19であり、したがってPEP4構造遺伝子を破壊している。

B. pDR401の断片によるHIS4P. パストリス (pastoris) 株GS115の形質転換

P. パストリス (pastoris) の PEP4株を作り出すため、HIS4 PEP4 P. パストリス (pastoris) 株GS115(ATCC 20864)がスフェロラバスト法(米国特許第4,879,231号参照)に従ってpDR401の5.3 kb EcoRI/SacI断片20 μgで形質転換された。pDR401のこの断片はHIS4遺伝子含有PEP4欠失遺伝子と一致している。この型の組み込みにより生じる形質転換株は原発性であり、それに基づいて非形質転換細胞から区別できる。形質転換の頻度は約10<sup>3</sup> μg<sup>-1</sup>DNAであった。

C. 形質転換体の特徴付け

## 特表平6-506117(10)

### 1. 形質転換体カルボキシペプチダーゼY活性の分析

*H. S.* 形質転換体は次にコロニーオーバーレイ比色スクリーニング法 [Jones, E. *Genetics* 85: 23-33 (1977) 参照] を用いてカルボキシペプチダーゼY活性が分析された。このアッセイでは、*H. S.* 形質転換体細胞は寒天プレートから離されプレート当たり～300コロニーの密度でYEPD (酵母抽物、1%ペブトン、2%テキストロースおよび2%寒天) プレート上で増殖された。細胞の透過性を上げるために、プレートに40%ジメチルホルムアミド (DMF) を含む0.6%アガロースゲルおよび1.2 mg/ml の基質APNE (N-アセチルD-Lフェニルアラニン-N-ナフチルエスチル) をかぶせた。細胞は透過性を上げるために、細胞の被包被物のいくつかは試薬APNEに近づくことができる。アガロースオーバーレイが固化後、プレートを5 mg/ml ファーストガーネット塩の溶液中に浸漬した。APNEはカルボキシペプチダーゼYのエステル分解活性により切斷される。この反応の生成物はファーストガーネット塩に結合してコロニー中赤色を発する。カルボキシペプチダーゼY活性を欠くコロニーは塩と結合せず、従ってこの活性を持つコロニーよりもより弱く染色される。*PEP4* コロニーはガーネット塩に曝露後最初の10-15分の間に赤色/ピンク色中心が現われる。対照的に、*PEP4* 遺伝子が欠失しているコロニーはこの色の発色が遅く、赤色*PEP4* コロニーに比較してピンク色と区別された。このアッセイの結果に基づいて低いカルボキシペプチダーゼY活性を持つことが明らかにされたコロニー (即ち、*PEP4* コロニーの指標としての弱い赤色を発色しなかったコロニー) が単離され、マスタープレートに移され、対照コロニーとともに離代培養され、オーバーレイアッセイを用いて再びスクリーニングされた。再び強い赤色を発色しなかった20のコロニーが、ベクタードR401の断片の組込みによりこれらの形質転換体の*PEP4* 遺伝子が破壊されているかどうかを決定するサンプロットハイブリダイゼーションによる分析のために選択された。

### 2. ササンプロットハイブリダイゼーション分析

低カルボキシペプチダーゼ活性を示した20の形質転換体株 (p1-p20と称される) からゲノムDNAが抽出され、*SacI* および *EcoRI* で消化され

た。この過程は *H. S.* 含有 *PEP4* 遺伝子を株の形質転換後に使用された5.3 kb *EcoRI*/*SacI* 断片として遊離させるはずである。これらの消化DNAから2つのサンプロットフィルターが調製された；1つのプロットはクローニングP. *パストリス (pastoris)* *PEP4* 遺伝子の一部を含むpEP301 (図4参照) からの放射性標識1.4 kb *XbaI*/*EcoRV* 断片で探査され、他のプロットは *H. S.* 遺伝子を含むpDR401からの放射性標識2.6 kb *BglII* 断片で探査された。比較的目的で *SacI* および *EcoRI* で消化されている形質転換体株GS115からの対照DNAも分析された。

*SacI* および *EcoRI* によるGS115からのゲノムDNAの消化により *pEP301* の放射性標識 *XbaI*/*EcoRV* 断片中に含まれている *PEP4* 遺伝子の一部にハイブリダイズする2.9 kb 断片が検出された。対照的にこのプローブは分析された20の形質転換体のうちの19からの *SacI*/*EcoRI* 消化DNA中の異なった大きさの断片にハイブリダイズした。株p17からのDNAのみが離株からのDNAハイブリダイゼーションパターンと同一のパターンを与えた。残りの19株は非破壊 *PEP4* 遺伝子位に特徴的な2.9 kb ハイブリダイズ断片を欠き、*PEP4* 遺伝子プローブへハイブリダイズする約5.3 kb 断片および/またはより大きな断片を含んでいた。5.3 kb 断片は *SacI*/*EcoRI* による消化によりベクタードR401から放出される形質転換DNAと同じ大きさであった。

株p1-p16およびp18-p20からのDNAのサンプロットハイブリダイゼーションの結果は、これらの株は無菌の *H. S.* 遺伝子とともに欠損 *PEP4* 遺伝子を含んでおり株の *PEP4* 遺伝子は破壊されていることを示している。P. *パストリス (pastoris)* の *PEP4* 株のより大規模な培養物のプロセスの蛋白質分解活性を分析するため、実験例1に記載されているように株p13が1リットル発酵で増殖された。

### 3. 形質転換体プロティナーゼA活性の分析

#### a. プロトコール

8つの形質転換株のプロティナーゼA活性が Jones et al. の方法

[*Genetics* 102: 655 (1982)] に基づく酵素アッセイを用いて評価された。いくつかの対照株もまたこのアッセイで評価された：*PEP4* および *S. cerevisiae* の *PEP4* 株 (株DBY747および20B12、各々 Yeast Genetic Stock Center, University of California, Berkeley, CA から) および P. *パストリス (pastoris)* の *PEP4* 野生型株 (株NRRL Y-11430, Northern Regional Research Center, Peoria, IL)。

プロティナーゼAはアスパルチルプロテアーゼ活性に関与する被包被酵素であり、*S. cerevisiae* の *PEP4* 遺伝子によりコードされている。形質転換細胞抽出物のプロティナーゼ活性の評価に使用される方法は酸変性ヘモグロビンからのプロティナーゼ媒介アミノ酸放出の測定に基づいている。形質転換細胞抽出物は酸変性ヘモグロビンとインキュベートされ、抽出物中に存在するプロティナーゼA活性はゼロ時間と90分のインキュベーション後に放出されるアミノ酸の量の相違を算定することにより決定された。

*S. cerevisiae* 対照株DBY747 (*PEP4*) および20B12 (*PEP4*), *PEP4* P. *パストリス (pastoris)* 株NRRL Y-11430 および P. *パストリス (pastoris)* の実験 *PEP4* 株の培養物を YEPD 培地で定期的に増殖させた。培養細胞 (20 OD<sub>600</sub> 単位) を 10 mM アジ化ナトリウム中で洗い、次に 400 μl の 100 mM トリス、pH 7.5 中細胞と該洗浄ガラスビーズを 1 分間ボルトックスすることにより溶離させた。溶離細胞はエーベンドルフチューブ中で 10 分間遠心分離して細胞破片を除去した。遠心後に得られた上澄液 (粗抽出物) は以下のごとくプロティナーゼA活性が試験された。酸変性ヘモグロビン (400 μl) を 50 μl の粗抽出物に加え、37°C で 90 分間インキュベートした。0.2 ml の 1 N 過塩素酸の添加により反応を停止させた。遠心分離により不溶性物質を除去し、200 μl の 0.3 M NaCl を 200 μl の上澄液に加えた。この溶液の 40 μl に対し、遊離アミノ酸のための Pierce BCA 蛋白質アッセイキット (例えば米国特許第4,839,295号参照) を用いてアッセイ

を行った。90 分間インキュベーションを行った試料中に存在する遊離アミノ酸の量がブランク (ゼロ時間で停止された反応混合物の試料から成る) 中に存在する量と比較された。これら 2 つの試料時間の遊離アミノ酸の相対的相違がプロティナーゼA活性の尺度である。

#### b. 結果

対照および形質転換株のプロティナーゼA活性の結果 (表1 参照: ΔOD が試料中の遊離アミノ酸の濃度の尺度である) は *S. cerevisiae* の *PEP4* 株の *PEP4* 株のプロティナーゼA活性は *S. cerevisiae* の *PEP4* 株のそれたった 10% であることを示している。同様に、*PEP4* 形質転換株 (株p1, p2, p5, p8, p13, p16 および p20) のプロティナーゼA活性も *S. cerevisiae* の *PEP4* 株のそれたった 10% の 1 のみである。P. *パストリス (pastoris)* の *PEP4* 野生型株は *S. cerevisiae* の *PEP4* 株の約半分のプロティナーゼA活性を示した。

表1

## プロティナーゼAアッセイ結果

株	表現型	$\Delta OD / \mu g$ 蛋白質
DBY747(S.セレビジエ(cerevisiae))	PEP4 <sup>+</sup>	28.1
20B12(S.セレビジエ(cerevisiae))	PEP4 <sup>-</sup>	2.7
P.バストリス(pastoris)対照 (NRRL Y-11430)	PEP4 <sup>+</sup>	13.1
p13	PEP4 <sup>-</sup>	3.3
p20	PEP4 <sup>-</sup>	4.2
p17	PEP4+(?)	7.5
p18	PEP4 <sup>-</sup>	0
p16	PEP4 <sup>-</sup>	0
p13	PEP4 <sup>-</sup>	3.3
p8	PEP4 <sup>-</sup>	3.3
p5	PEP4 <sup>-</sup>	5.0
p2	PEP4 <sup>-</sup>	6.6
p1	PEP4 <sup>-</sup>	6.0

欠失PEP4遺伝子によるPEP4株の形質転換により発生されたPEP4<sup>-</sup>。P.バストリス(pastoris)株のプロティナーゼAアッセイで得られたデータは、形質転換により破壊された形質転換体のPEP4座位を示したこれらの形質転換体からのDNAのサンプル分析の結果と一緒にした。

## 実施例11：P.バストリス(pastoris)のPEP4株の発酵

## A. 方法

ベクターpDR401のPEP4遺伝子含有SacI/EcoRI断片で株G S115を形質転換することにより発生させたP.バストリス(pastoris)のPEP4株、p13はグリセロールバッチ増殖相、制限グリセロール供給バッチ相およびメタノール供給バッチ相からなる組プロトコールに従って以下のとく1リットル発酵により増殖された。

はPorapak Qカラム(Agiltech)を用いるガスクロマトグラフィーにより決定された。

さらに、培養物の濃度重量が発酵槽中の細胞増殖の指標として決定された。この目的のために、発酵培養物の1mlをマイクロフュージ中4分間遠心分離し、上澄液を傾斜させて捨て、濃縮ペレットを秤量した。

## C. 結果

1リットル発酵中のP.バストリス(pastoris) p13のPEP4株の増殖は発酵の時間毎の時間で発酵培養物の濃度重量(g/L)を決定することによりモニターされた。発酵のメタノール供給バッチ相の間のp13株の増殖の時間変化は、類似の1リットル発酵の間のHIS4-PEP4株G+PAO804H2(野生型HIS4遺伝子を含む発現ベクターでHIS4-PEP4 P.バストリス(pastoris)株CS115を形質転換することにより発生する)の増殖の時間変化と比較した場合、P.バストリス(pastoris)のPEP4株の増殖能力はPEP4株のそれと匹敵することが示された。

## 実施例IV：1リットル発酵で増殖されたP.バストリス(pastoris)のPEP4株のプロスの蛋白質分解活性の分析

P.バストリス(pastoris)PEP4遺伝子の破壊がP.バストリス(pastoris)のプロス蛋白質分解活性の変化を伴ったかどうかを決定するため、PEP4株、株p13、およびPEP4株の1リットル発酵からのプロスの蛋白質分解活性が比較された。この研究においては、2つの異なるペプチド、表皮増殖因子(EGF;米国特許出願番号323,964号に記載されていること、標品53アミノ酸EGF分子の最初の52アミノ酸から成る組換えで合成された分子)および成長ホルモン放出因子(GRF;EP206783に記載されていること組換えで合成された)が別々にPEP4 P.バストリス(pastoris)株p13の1リットル発酵からの細胞を含まないプロス中、およびHIS4-PEP4 P.バストリス(pastoris)株G+PAO804H2の同様な1リットル発酵からの細胞を含まないプロス中で室温にてインキュベートされた。特定の期間のインキュベーションの後、各々のインキュベーション混合物の一部が逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により試験

1000mlの最小培地(21ml 8.5%リン酸、0.9g硫酸カルシウム・2H<sub>2</sub>O、14.3g硫酸カリウム、11.7g硫酸マグネシウムおよび3.2g水酸化カリウム)および2%グリセロールを含む2リットルの発酵槽をオートクレーブした。殺菌後、4mlのPTM微量塩溶液[6g/L硫酸銅、5H<sub>2</sub>O、0.8g/Lヨウ化ナトリウム、3g/L硫酸マンガン・H<sub>2</sub>O、0.2g/Lホウ酸、0.5g/L塩化コバルト、2.0g/L塩化亜鉛、6.5g/L硫酸第一鉄・H<sub>2</sub>O、0.2g/Lビオチンおよび5ml磷酸]を発酵槽に添加し、過NHOHでpHを5に調整した。培地のpHは0.1%ストルクトールJ673泡消剤を含む5.0%NH<sub>4</sub>OHを添加することにより5に維持された。接種物は緩衝化酵母液性培基(YNB)グリセロールブレート(リン酸緩衝液YNB、2%グリセロール、2%麥芽)から調製され、2%グリセロールを含むリン酸緩衝液YNB(1.5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2.66g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.67%酵母液性培基、pH5)中30℃にて一夜増殖させた。1~8のOD<sub>600</sub>まで増殖されている培養細胞の1.0~5.0mlを発酵槽に接種し、バッチ増殖をグリセロールが枯渇するまで1日間続ける。グリセロール枯渇した時点で(溶存酸素の増加により示される)、1.0ml/hでのグリセロールの供給(5.0%グリセロールに1.2ml/LのPTMを加えたもの)を開始し、4.0mlのグリセロールが添加されるまで続ける。グリセロール供給の終了後、メタノールの供給(10.0%メタノールに1.2ml/LのPTMを加えたもの)を約2ml/hの初期速度で開始した。3時間後メタノール供給速度を6ml/hに増加させた。メタノール供給速度は12~18時間6ml/hに維持し、次に10ml/hに増加し、発酵を持续する間10ml/hに維持された。4.0mlのメタノールが発酵槽に添加された後、容器を取り出した。

## B. 試料調整

発酵培養の試料(15mlづつ)は発酵工程を通して種々の時間隔隔で発酵槽から取り出した。各々の試料は6500xgで5分間遠心分離してプロスおよび細胞を分離した。これらの時点でのNHOH、泡消剤、グリセロールおよびメタノール蓄積のレベルが記録された。上澄中のメタノールおよびエタノール濃度

されて(下に記載)各々の試料中に残存する無傷のペプチドの量が決定され、それによりペプチドの蛋白質分解の程度が決定された。

## A. 逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

緩衝液およびP.バストリス(pastoris)株の発酵からのプロス中のEGFおよびGRFペプチドの分析に使用された逆相HPLC系は、Waters 600(Bedford, MA)溶媒送達システム、Watersモデル481Lambda Max可変波長検出器、Wisp 710BオートインジェクターおよびShimadzu Chrom-Pac捕分器(Cole Scientific, Moorepark, CA)である。PEP4 P.バストリス(pastoris)株p13およびHIS4-PEP4 P.バストリス(pastoris)株G+PAO804H2の発酵によるプロス試料は0.1Mリン酸ナトリウム、pH5.0で1:10に希釈した。1.5マイクロリットルの濃縮GRF貯蔵液(2.85μl)の希釈プロスに添加され4時間インキュベートされた。リン酸緩衝液で同様に希釈したGRF貯蔵液もまた対照として4時間インキュベートされた。6.0マイクロリットルのEGF貯蔵液は240μlの希釈プロスまたは緩衝液に添加され、8時間インキュベートされた。各々のインキュベーション混合物試料は別々に、Waters μBondapak C18逆相カラムにインジェクションされた。20~60%移動相B(95%アセトニトリル、5%水、0.1%トリフルオロ酢酸)の20分での直線濃度勾配によりペプチドがカラムから溶出された。移動相A(0.1%トリフルオロ酢酸)は溶出濃度勾配を作製する移動相Bの希釈に使用された。

## B. 捕集

0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0、中に含まれている無傷のEGFまたはGRFおよびプロス中に含まれているEGFまたはGRFのHPLC分析で得られたクロマトグラムを比較することにより無傷のペプチド【PEP4 P.バストリス(pastoris)株の発酵プロスおよびP.バストリス(pastoris)株G+PAO804H2のプロス中でインキュベートされたEGFまたはGRF分子】の量が評価された。標準の無傷のペプチドのHPLC分析によるクロマトグラムは試料中に存在する標準ペプチドの量およびペプ

チドの特有の保持時間を反映した主ピークから成っている。対照的に両方のペプチドの蛋白質分解断片は無傷のペプチドに間連した保持時間と異なった種々の長さの時間HPLCカラム上に保持される。従って、両方のペプチド(EGFまたはGRF)の蛋白質分解断片のHPLC分析からのクロマトグラムはピークの数および大きさおよび断片化程度に付随する保持時間などが無傷のペプチドのHPLC分析で得られるクロマトグラムと異なっている。これらの相違に基づいて、プロシンキュベーション試験中の無傷のEGFまたはGRFペプチドの量を算定することが可能であった。

PEP4 P. パストリス (pastoris) 対照プロス中でインキュベートされたGRFおよびEGF試料のHPLC分析に基づくと、PEP4株G+PAO804H2の発酵からのプロス中でインキュベーションした後、10%未満の各々の2つのペプチドが無傷で残っていることが決定された。対照的に、PEP4 P. パストリス (pastoris) 株のプロス中のこれらのペプチドの蛋白質分解のレベルはPEP4株のプロス中よりも著しく低い(4時間のインキュベーション後でも>60%のGRFが無傷で残存；8時間のインキュベーション後でも>90%が無傷で残存)。これらのデータはP. パストリス (pastoris) のPEP4遺伝子の破壊は株のプロス中の蛋白質分解活性をかなり減少させることを示している。

#### 実施例V: P. パストリス (pastoris) URA3 遺伝子の単離

P. パストリス (pastoris) URA3 遺伝子は、大腸菌株CSH-28中の $\text{pyrF}$ 突然変異(オロチジン-リーン酸デカルボキシラーゼ活性の欠失に対応する)を補足するその能力でプラスミド(YE p13)に基づくピキア(Pichia)ゲノムライプラリー中に同定される。P. パストリス (pastoris) URA3 遺伝子はライプラリーDNAで形質転換され、ウラシルを欠く培地で増殖できる大腸菌株CSH-28のコロニーを単離することによりクローニングされた。

#### A. P. pastoris (P. パストリス) YE p13 ゲノムDNAライプラリー

プラスミド $\text{YE p13}$  [Broach等, Gene 8: 121-133 (19

用いた、10個のプラスミドの中の10個がこの菌株のウラシル要求性を高頻度で相補した。P. パストリス $\text{YE p13}$  ゲノムライプラリーDNAによるCSH-28の形質転換によって発生した選択形質転換細胞の一つは6. 6kb SphIフラグメントを含む9. 0kbインサートを収容する。6. 6kb SphIフラグメントをさらに分析するためにpUC19のSphI部位にサブクローニングした。

この形質転換細胞からのプラスミドDNAをSphIによって消化させ、0. 6%アガロースゲル上の電気泳動に供した。DE81ペーパーを用いて6. 6kbフラグメントを単離し、このペーパーから1M NaCl 400μlによって溶出した。DNAはフェノール/クロロホルム 400μlによって抽出し、エタノールによって沈殿させた。次に、6. 6kbフラグメントをアルカリホスファターゼ処理SphI消化pUC19と結合させた。この結合混合物を用いて大腸菌MC1061細胞を形質転換させた。アンビシリントリニン耐性形質転換細胞を制限酵素消化コロニー-DNAの分析によって6. 6kb SphIフラグメントの存在に関してスクリーニングした。この正確なプラスミドはpPU201と名付けた。プラスミドpPU201を用いてCSH-28を形質転換させた、このプラスミドはこの菌株のウラシル要求性を相補することができた。

#### C. プラスミドpPU201におけるインサートの特性化

pPU201を種々な酵素によって消化させ、生ずるフラグメントをDNA長さコンピュータプログラム(MapSort; ウィスコンシン大学 Genetics, ウィスコンシン州, マジソン)を用いて分析して、フラグメントの大体のサイズを判定することによって、プラスミドpPU201中のP. パストリス DNAの6. 6kbインサートの制限酵素認識部位の地図(図6)を作成した。pPU201の6. 6kbインサート中に含まれるURA3遺伝子を正確に描写するために、pPU201の各制限酵素消化物の5ngアリコートを1%アガロースゲル上での電気泳動によって分離させ、ニトロセルロースに移し、C. tricalicollis (C. トロビカリス) URA3A遺伝子の放射能標識1. 3kb BglII [フラグメントによって調べた(PCT公報第WO90/09449号を参照のこと)。2.5%ホルムアミド、6xSSC、5xDenhardt's溶

液、20mM Tris-HCl、pH 8. 0、1mM EDTA、0. 1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)及び100μg/mlサケ精子DNAを含む溶液を用いて、フィルターをこのプローブに27°Cにおいてハイブリッド形成した。ハイブリッド形成後に、フィルターを1xSSCと1%SDSを用いて、室温において、1回洗浄につき5~10分間かけて、3回洗浄し、次に0. 5xSSCと0. 5%SDSを用いて、45°Cにおいて、1回洗浄につき10分間かけて、2回洗浄した。これらの緩和な条件は互いに異なるURA3遺伝子配列の間のハイブリッド形成を可能にした。pPU201の各消化物の追加のサンプルを同じ1%アガロースゲル上で分離し、ハイブリッド形成フラグメントと非ハイブリッド形成フラグメントとを比較するためにオキシエテジウムによって染色した。ハイブリッド形成フラグメントとpPU201の制限マップとの比較は、pPU201中のURA3遺伝子を図6に示す約1. 3kb NcoI-SmaI フラグメントに局在化することを可能にした。これを知ることによって、次には、P. パストリス URA3遺伝子の塩基配列を決定し、さらに特徴化するために適したサブクローンを構成することが可能になった。

pPU201をEcoRVとPstIとによって消化させ、URA3遺伝子を含む約4. 0kbフラグメントを単離し、これをpUC19中にSmaIとPstI部位において結合することによって、プラスミドpPU202(図7)を形成した。pPU202をそれぞれ、SacI、KpnI及びEcoRIによって消化させ、大量(200μl)に再結合させることによって、プラスミドpPU203、pPU205及びpPU206(図8-10)を形成した。クローニングP. パストリスゲノムインサートDNAフラグメント中並びにpPU202のpUC19ボリリンカー中にこれらの酵素の各々の認識部位が存在するので、この方法はpPU202中のこれらの部位の間のDNAの便利な除去を可能にした。生ずるプラスミドを次に用いて、大腸菌株CSH-28を形質転換させて、各欠失構造体が $\text{pyrF}$ 突然変異を相補するか否かを判定した。この結果はpPU203とpPU205がウラシルを含まない含成培地上で $\text{pyrF}$ 菌株の増殖を可能にする機能URA3遺伝子を含むが、pPU206は含まないことを実証した。これらの研究結果はpPU201におけるP. パストリス URA3遺伝子の地図

## 特表平6-506117 (13)

作成 (mapped) 位置と一致する。

推定の (putative) URA3 遺伝子を有する P. パストリスゲノム DNA フラグメントのサブクローンを Sanger ジオキシ方法によって塩基配列決定した [Sanger 等の Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467 (1977) を参照のこと]。この構造遺伝子と約 100 bp のランキング配列との塩基配列を西方向において調べて、配列番号 3 に表す。クローン化 P. パストリス URA3 遺伝子から演繹されるアミノ酸配列 (配列番号 4 を参照のこと) は、S. セレビジエ URA3 遺伝子から演繹されるアミノ酸配列との 73% 相同を有し、C. トロピカリスの URA3A と URA3B 遺伝子から演繹されるアミノ酸配列との 71% 相同を有し、*Kleuveromyces lactis* (クロイベロミセス ラクチス) URA3 遺伝子から演繹されるアミノ酸配列との 72% 相同を有する。

実施例 V 1 : ピキアの IGF-1 発現 PEP4 欠失 (PEP4-) 菌株の発生

A. 遺伝子組み換えによる IGF-1 発現 PEP4 損傷の発生

### 1. P. パストリス PEP4 遺伝子破壊ベクター pDR421 の形成

内因性 PEP4 座に不完全 PEP4 遺伝子を加えることによる、宿主 PEP4 遺伝子の破壊によって、ピキア パストリスの PEP4 欠失 (PEP4-) 菌株の発生に用いるためのプラスミド pDR421 を形成した。このベクターは PEP4 遺伝子の内部部分を含み、この部分は P. パストリスの PEP4 菌株の形質転換に用いる場合に、PEP4 座において宿主ゲノムに結合して、PEP4 遺伝子の不完全な非機能性コピーを発生させる。

破壊ベクター pDR421 を発生させるために、ピキアの URA3 遺伝子をベクター pEP205 (pUC19 配列と、pEP202 から誘導される -450 bp BamHI フラグメントに含まれる PEP4 遺伝子部分とから成る) にクローン化させた。これは、pEP205 の XbaI-SphI 部位 (図 3 参照) 中に 2 kb SphI-SphI DNA フラグメントとして pPU205 からの URA3 遺伝子 (図 9 参照) をサブクローン化することによって実施した。

プラスミド pPU205 を SphI と SphI によって消化させ、この反応混合物を 0.8% アガロースゲル上で分離させた。URA3 遺伝子を含む 2 kb

DNA フラグメントを DE81 ベーパーを用いてゲルから単離させ、溶離し、精製した。プラスミド pEP205 を XbaI と SphI によって消化させた。pPU205 から単離させた 2 kb URA3 遺伝子含有 SphI-SphI フラグメントを XbaI-SphI 消化 pEP205 に結合させ、この混合物を用いて大腸菌株 MC1061 をアンビシリコン耐性に形質転換させた。アンビシリコン耐性コロニーを、BamHI-SphI 制限酵素消化コロニー-DNA の 2, 7 kb, 0, 4 kb, 1, 9 kb 断片フラグメントの存在に関する分析によってスクリーニングした。形質転換体は pDR421 と名付けられた正確な DNA 構造を有するプラスミドを含むことが判明した (図 1)。

### 2. IGF-1 発現 URA3 P. パストリス菌株 (IGF-U) の pDR421 による形質転換

P. パストリスの URA3 IGF-1 発現菌株、IGF-U、を pDR421 によって形質転換させて、P. パストリスの PEP4, IGF-1 発現菌株を発生させた。

### 3. IGF-U の発生

5-フルオローオロチニ酸 (5-FOA) はウラシル生合成経路中間体の類似体であり、これは Ura<sup>-</sup> 菌株によって消化されるときに有害な化合物を生ずる。Ura<sup>-</sup> 菌株によるウラシル生合成経路はある一定の段階においてブロックされるので、これらの菌株は 5-FOA (細胞にとって有害な化合物を形成する) を代謝せず、このため 5-FOA 耐性である。これに反して、Ura<sup>-</sup> 菌株は 5-FOA を代謝し、5-FOA 含有培地上では生き残ることができない。それ故、5-FOA 含有培地上での細胞増殖は自然突然変異によって Ura<sup>-</sup> 菌株を発生させるための方法として用いることができる [例えば、Boekel 等, Mol. Gen. Genet. 197: 345-348 (1984) を参照のこと]。

IGF-1 発現菌株 G+IMB206S1 の URA3 誘導体 [この菌株の説明に関しては、ここにその全体において参考文献として関係する、1990年9月4日出願の共通に渡された米国特許出願第 07/578,728 号を参照のこと] は、ウラシル補充 5-FOA 含有培地 [0.67% 脱水重炭酸塩、2% 寒天、2% グルコース、5-FOA 750 mg/l] とウラシル 48 mg/l 中にこ

の菌株の  $5 \times 10^7$  細胞を直接培養することによって形成された。30°C における 1 週間の培養後に、この平板上で増殖する IGF-U と名付けられたコロニーを単離した。増殖のためにウラシルを必要とする、このコロニーはピキア パストリスの URA3 菌株を相補することができなかった。

### b. IGF-U の形質転換

pDR421 の  $20 \mu\text{g}$  を BglII によって消化させ、標準スフェロプラスチ形質転換法による IGF-U の形質転換に用いた。形質転換体を 6 日間にわたるウラシル不存在下で増殖しうるか否かによって選択した。

### 3. 形質転換体の特性化

#### a. 形質転換体カルボキシペプチダーゼ Y 活性の分析

Ura<sup>-</sup> 形質転換体を、次に実施例 I 1 に述べるようなコロニー-オーバーレイ比色検査法によって、カルボキシペプチダーゼ Y 活性に関して分析した。この分析結果に基づいて低カルボキシペプチダーゼ Y 活性を有するように思われる Ura<sup>-</sup> 形質転換体のコロニー (すなわち、PEP4+ コロニーを指示する強い赤色を発色できなかったコロニー) を単離し、マスタープレイス (master plate) に移し、対照コロニーと共に継代培養し、オーバーレイ分析法を用いて再スクリーニングした。再度強い赤色を発色することができなかった 1 コロニーを M+IMB206S1 と名付けた。

#### b. 1 リットル発酵と 10 リットル発酵とで増殖した P. パストリスの IGF-1 発現 PEP4 菌株の完全な IGF-1 発現レベルの分析

##### 1. P. パストリスの IGF-1 発現 PEP4 菌株の発酵

実施例 V 1, A, 2, b, に述べたように形成された P. パストリスの IGF-1 発現 PEP4 菌株、M+IMB206S1 をグリセロールバッヂ増殖培、制限グリセロール供給バッヂ相及びメタノール供給バッヂ相から成る三相プロトコールによる 1 リットル発酵と 10 リットル発酵において増殖させた。P. パストリスの PEP4 IGF-1 発現菌株の完全な IGF-1 発現レベルを比較するために、IGF-1 遺伝子発現カセットの 4 コピーと 6 コピーをそれぞれ含む、P. パストリスの 2 種 PEP4 菌株、G+IMB204S14 と G+IMB206S1 をも次のように比較可能な発酵において増殖させた。

### 1 リットル発酵プロトコール

2 リットル発酵器 (Bio-lafitte, ニュージャージー州、プリンストン) に最少培地 900 ml (8.5% リン酸 21 ml、硫酸カルシウム 2 H<sub>2</sub>O 0.9 g と、硫酸カリウム 14.3 g と、硫酸マグネシウム 1.1.7 g と、水酸化カリウム 3.2 g) とグリセロール 30 g とを加えて、オートクレーブ処理した。滅菌後に、PTM<sub>1</sub> (trace) 塩浴液 (硫酸第二銅・5 H<sub>2</sub>O 6 g/l、ヨウ化ナトリウム 0.08 g/l、硫酸マンガン・H<sub>2</sub>O 3 g/l、モリブデン酸ナトリウム・2 H<sub>2</sub>O 0.2 g/l、ホウ酸 0.02 g/l、塩化コバルト 0.5 g/l、塩化亜鉛 20 g/l、塩化亜鉛 20 g/l、硫酸第一銅・H<sub>2</sub>O 6.5 g/l、ビオチン 0.2 g/l、及び硫酸 5 ml) 4 ml を発酵器に加え、pH を  $\text{pH } 7.0$  によって 5 に調節した。pH は 0.1% Strep to J 673 消泡剤 (泡を抑制するために加える) を含む 5.0% NH<sub>4</sub>OH の添加によって調節した。温度を 30°C に維持し、溶解酸素を搅拌、通気、又は酸素を含む空気供給 (feed) の補充の強化によって飽和の 20% 以上に維持した。

2% グリセロールを含む緩衝液 (buffered) YNB 中で 30°C において一晩増殖させた細胞から接種物を形成した。発酵器に OD<sub>660</sub> 2~8 までに増殖させた培養細胞 4.0~7.0 ml を接種し、バッチ増殖法 (growth regimen) をグリセロールが消耗されるまで 18~24 時間続けた。溶解酸素濃度の増加によって指示されるグリセロール消費の時点で、グリセロール供給 (50% w/v グリセロール プラス 1.2 ml/L PTM<sub>1</sub>) を 1.0 ml/時で開始した。pH 5.0 発酵では、培養物の pH を発酵を通して 5 に維持した。低 pH 発酵 (すなわち、pH 2.8 又は pH 3.5) では、グリセロール供給の開始後に、pH コントローラーの設定点を所定の pH に調節した。4 時間後に、細胞代謝の結果として培養物の pH はこの設定点値にまで低下した。この低い pH を発酵の残りを通して維持した。次にグリセロール供給を停止し、メタノール供給 (100% メタノール プラス PTM<sub>1</sub> 1.2 ml/L) を 2 ml/時での速度で開始した。3 時間のメタノール供給後、供給速度を 6 ml/時にも高め、この速度を発酵の残りに対して維持した。メタノール供給の開始から 7.2 時間後

## 特表平6-506117 (14)

に、容器を回収した。

発酵液を  $\text{NH}_4\text{OH}$ 、消泡剤、グリセロール、メタノール、エタノール、及び細胞重量レベルに関して実施例 I I に述べたように監視した。プロス (broth) サンプルと細胞サンプルも実施例 I I に述べたように発酵液を通して回収した。

### 10リットル発酵プロトコール

5. 5リットルの量で、10X基本塩 (8.5% リン酸 4.2mM/L、硫酸カルシウム・ $2\text{H}_2\text{O}$  1.8g/L、硫酸カリウム 2.8.6g/L、硫酸マグネシウム 2.3.4g/L、水酸化カリウム 6.5g/L) 3.5リットルとグリセロール 22.0gとを含む15リットル発酵器を滅菌した。発酵器が冷却した後に、PTM、微量塩 2.4mLを加え、pHを2.8%水酸化アンモニウムの添加によって5に調節した。pHは同溶液の添加によって調節した。起泡は Struktool J 673の5%液の添加によって制御した。温度は30°Cに維持し、溶解酸素は搅拌、通気、反応器圧の強化によって又は酸素を含む空気供給の補充の強化によって総合の20%以上に維持した。2%グリセロールを含む培養基 (YNB: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 11.5g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.66g/L、酵母抽出液 6.7g/L, pH 6) 中で一晩増殖させた細胞から接種物を作製した。発酵器にOD<sub>600</sub> 2~8までに増殖させた培養細胞 5.00~7.00mLを接種し、バッチ増殖法を18~24時間続けた。溶解酸素濃度の増加によって指示されるグリセロール消耗の終点で、グリセロール供給 (50%w/vグリセロール プラス 1.2mL/PTM) を1.00mL/時で開始し、4時間続けた。次にグリセロール供給を停止し、メタノール供給 (100%メタノール プラス 1.2mL/PTM) を2.0mL/時の速度で開始した。メタノール供給の開始と共に、pHコントローラーの設定点を2.8に調節した。次にpHは細胞代謝の結果として、設定点まで徐々に低下した。4時間のメタノール供給後に、メタノール供給速度を6.0mL/時に高め、この速度に全体で7.2時間維持し、7.2時間目に容器を回収した。

### II. PEP4 IGF-1 発現菌株の IGF-1 発現レベル

P. パストリスの組換え体 IGF-1 分泌菌の発酵で産生される数形式の I

GF-1の一つは、ジスルフィド結合によって一緒に維持される2個以上のIGF-1分子フラグメントから成る、ニックが入った (nicked) 種である。これらのフラグメントはIGF-1分子のアミノ酸バックボーンの1個以上のペプチド結合のタンパク分解開裂によって形成された。ニックドIGF-1分子と完全IGF-1分子とは見かけの分子量 [非還元性条件下で、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって測定] に基づいては識別不能であるが、これらの種は非還元性条件下での逆相HPLCによって、また還元性条件下 (すなわち、例えばジオオスレイトールのような還元剤の存在下) でのSDS-PAGEによって分離することができる。ニックが入ったIGF-1のフラグメントを保持するジスルフィド結合の遺伝子は、完全な分子よりも小さい分子量を有する、タンパク分解によって生ずる個々のフラグメントを遮離せざる。

### IGF-1 発現レベルの定量

細胞を含まないプロスにおけるニックドIGF-1と真正の (authentic) (完全な、正確に折り畳まれた、モノマー) IGF-1の収量を定量逆相HPLCによって測定した。用いたHPLC系は、C18カラムの代わりにVydac C4カラム (0.46×5cm) を用いた以外は、実施例 IV で述べた系と同じであった。1%/分勾配の2.5~4.2%移動相をカラムに1mL/分の流速で1.7分間通して、このカラムからサンプルを溶出した。検出器を0.05吸光度単位フルスケール (AUFS) にセットし、最大感度のために215nmの波長を用いた。

P. パストリス プロス中の真正IGF-1種とニックが入ったIGF-1種とをHPLCによって識別するために、プロス サンプルをHPLCカラムに負荷する前にプロスから若干の内因性P. パストリス汚染物を除去することによって、プロスを洗浄することが必要であった。これは、このプロスを0.25mLカラムに含まれるスルホプロピルベースカチオン交換樹脂に通すことによって達せられた。この樹脂を最初に0.2M酢酸によって洗浄し、次に0.02M酢酸 2mLと平衡化させた。一定量の細胞を含まない粗プロス (1mL) をカラムに負荷し、このカラムを0.02M酢酸 1mLによって洗浄した。IGF

-1を0.02M 酢酸ナトリウム、pH 5.5、プラス 1M NaCl の2mLによって溶出した。溶出液の最初の1mLは全IGF-1の75~80%を含み、通常は回収された唯一の溶出量であった。カラムを次に100%メタノール 2mLによる洗浄によって再生し、それによって再使用のために利用可能にした。

ビキニア産生 IGF-1 のレベルの定量のために、既知量の標準 IGF-1 (Amgen、カリフォルニア州、オースト) をHPLCカラムに注入し、クロマトグラムの対応ピーク以下の面積を測定した。面積をHPLCカラムに負荷した IGF-1 の  $\mu\text{g}$  に対してプロットすることによって、標準曲線を形成した。HPLCクロマトグラム ピーク以下の面積を IGF-1 濃度に換算するために用いる相関係数を標準曲線から算出した。検出器を0.05AUFSと215nmの波長にセッティの場合に、相関係数はカラムに注入した IGF-1 について 3.50 単位/ $\mu\text{g}$  であった。この情報を用いて、洗浄されたプロス サンプル中に存在する正確に折り畳まれた、完全なモノマー IGF-1 の濃度を、サンプルのHPLC分析からのクロマトグラムの対応ピーク以下の面積の測定によって、算出することができた。この相関係数を用いて、ニックが入った IGF-1 種の大体の濃度をも同様に算出した。しかし、ニックが入った種の絶対濃度は完全 IGF-1 とニックが入った IGF-1 の固有相関係数の差に依存して変動する。

### 1リットル発酵の結果

該 PEP4 IGF-1 発現菌株の 1リットル低 pH (pH 2.8) 発酵は一貫して、PEP4 IGF-1 発現菌株の 1リットル低 pH 発酵 ( $\sim 180\text{--}190\text{mg/L}$ ) よりも多量の純モノマー (真正 プラス ニックド) IGF-1 ( $\sim 200\text{--}250\text{mg/L}$ ) を生成した。さらに、該 PEP4 菌株のプロス中の真正 IGF-1 の割合は PEP4 菌株のプロスにおける同割合 (6.5%) よりも多少高かった (7.7%)。しかし、該 PEP4 菌株と PEP4 菌株とのモノマー IGF-1 産生レベルの非常に大きい明瞭な差が、これらの菌株の pH 5.0 発酵において検出された。PEP4 IGF-1 発現菌株、G+IMB204S14 と G+IMB206S1との1リットル pH 5.0 発酵においては IGF-1 は本質的に検出されなかった。この結果は、PEP4 菌株の発酵において産生

される真正 IGF-1 が pH 5.0 においては大規模なタンパク分解を受けるが、低い pH ではごく限られたタンパク分解を受けるに過ぎないことを示す。これに反して、該 PEP4 IGF-1 発現菌株 M+IMB206S1 の 1リットル pH 5.0 発酵は少なくとも 200mg のモノマー IGF-1 / L を生じ、その約 80% は真正 IGF-1 であった。従って、該 PEP4 IGF-1 発現菌株は PEP4 IGF-1 発現菌株に比べて pH 5.0 における真正 IGF-1 の産生に関して有意に改良され、pH 2.8 における真正 IGF-1 の産生に関して多少改良されたように見える。

### 10リットル発酵の結果

P. パストリスの該 PEP4 IGF-1 発現菌株の 10リットル発酵は、PEP4 IGF-1 発現菌株の 10リットル発酵 ( $\sim 170\text{mg/L}$ ) よりも多量の純モノマー IGF-1 ( $\sim 200\text{mg/L}$ ) を生成した。

該 PEP4 菌株と PEP4 菌株の 10リットル発酵において産生される純モノマー IGF-1 の組成も異なった。該 PEP4 菌株 M+IMB206S1 の 10リットル発酵における純モノマー IGF-1 の 75% ( $164\text{mg/L}$ ) 以上が真正 IGF-1 であったが、PEP4 菌株 G+IMB204S14 の 10リットル発酵における純モノマー IGF-1 の約 50% ( $88\text{mg/L}$ ) のみが真正 IGF-1 であった。

さらに、該 PEP4 菌株の発酵における細胞収率は PEP4 菌株の発酵における細胞収率よりも ~30% 低かったので、真正 IGF-1 の細胞当たりの収率は PEP4 菌株の発酵において非常に強化された。該 PEP4 菌株の発酵における細胞収率が低い結果として、該 PEP4 菌株の発酵から多量の細胞を含まないプロスが回収された (PEP4 菌株の発酵から回収される細胞を含まないプロスの量に比べて)。これは該 PEP4 菌株の発酵から回収される細胞を含まないプロスを生ずる (PEP4 菌株の発酵から回収される細胞を含まないプロスの量に比べて)。

上記結果は、該 PEP4 IGF-1 発現菌株が真正 IGF-1 の産生に関して、PEP4 IGF-1 発現菌株に比べて、大規模に改良されることを実証する。

### B. 連鎖子置換による IGF-1 発現 PEP4 菌株の発生

1. P. バストリス遺伝子壁増ベクターpDR601とpDR602の形成  
ベクターpDR601とpDR602とを、欠陥PEP4遺伝子による内因性PEP4遺伝子の置換による宿主PEP4遺伝子の破壊によるPEP4欠損(PEP4-)菌株の発生に用いた。このベクターは下記のように数工程で形成した(図1-3の構造も参照のこと)。

pUC19配列と、pEP202からのクローニングP. バストリスPEP4遺伝子とから成るプラスミドpEP301(図4参照)をNcoIによって開裂し、次にDNAをエタノールによって沈殿させ、回収し、再懸濁させ、連続反応混合物中に連絡させた。この消化と連絡は~0.5kb NcoIフラグメントに含まれるPEP4遺伝子の内部部分を効果的に除去した。連絡後に、DNAをBglIIによって消化させ、残りの環プラスミドを直鎖化し、このDNAを用いて、大腸菌MC1061を形質転換させる。アンビシリントロポニンを選択して、コロニー-DNAの制限酵素消化物の分析によって、0.5kb NcoIフラグメントの存在を示すスクリーニングした。~0.5kb NcoIフラグメントを含まない欠陥PEP4遺伝子を含む正確なプラスミドはpDL321と名付けた。第2プラスミド、pUC19XXは、SmaIとHincIIによってpUC19を開裂させ、再連結させ、BamHIとXbaI部位を含むボリリンカー部分を効果的に除去することによって形成した。次に、プラスミドpUC19XXをSacIとEcoRIによって切断し、~10ngをpDL321のSacI/EcoRI 2.2kbフラグメントの~50ngと結合させた。このフラグメントはゲル精製され、DE81ペーパーによって単離されたものである。この結合ミックスを用いて、MC1061細胞を形質転換させ、BglII/XbaI消化コロニー-DNAの分析によってアンビシリントロポニンをスクリーニングした。正確な消化物パターンを示すプラスミドはpDL322と名付けた。

次にpDL322をXbaIによって切断し、10ngを配列5'-CTAG CGGGCG-3'のオリゴヌクレオチドリンクー10ngと結合させた、このリンクーはXbaI部位に結合されたときにXbaI部位を破壊させ、独特のNotIを形成した。この結合ミックスを用いて、MC1061細胞を形質転換させ

せた。アンビシリントロポニンをNotI消化コロニー-DNAの分析によってスクリーニングした。正確なプラスミドをpDL323と名付けた。

ベクターpDR601とpDR602とを形成するために、ピキアURA3遺伝子を下記のようにpDL323中に挿入した。プラスミドpPU205(図9参照)をPvuIIとAatIによって消化させ、約2.5kb PvuIIフラグメント上のURA3遺伝子を避難させた。この消化物を0.8アガロースゲル上で分離させた。~2.5kbフラグメントをDE81ペーパーを用いてゲルから単離させ、溶出し、精製した。プラスミドpDL323をEcoRVによる切断によって直鎖化した。この直鎖化プラスミド(~10ng)をpDU205とURA3含有PvuIIフラグメントと結合させて、挿入されるURA3遺伝子の配向に依存して、pDR601とpDR602とを形成した(それぞれ、図14と15を参照のこと)。

2. pDR601とpDR602によるIGF-Uの形質転換  
URA3-IGF-U発現P. バストリス菌株IGF-U(実施例VI.A.2. aを参照のこと)をpDR601とpDR602とから説明されたDNAの直鎖状フラグメントによって形質転換させた。この直鎖状フラグメントは各側でPEP4遺伝子の一部をコードするDNAによってフランクされるURA3遺伝子を含有了。このフラグメントの末端とPEP4遺伝子との相容性はこのフラグメントのPEP4産出における組込みを刺激し、遺伝子置換イベントを生じた。宿主ゲノム中へのいずれのフラグメントの安定な組込みも、フラグメントに含まれるURA3遺伝子の存在のために原発變株形質転換体を生じた。この形質転換は下記のように実施した:

pDR601とpDR602の両方をNotIとBglIIによって消化させることによって、各側でPEP4遺伝子の一部をコードするDNAによってフランクされるURA3遺伝子から成る直鎖状DNAフラグメント(~4.0kb長さ)を得た。消化されたDNA(20μg)を用いて、標準スフェロプラス方法によって宿株IGF-Uを形質転換させた。再生培地上で増殖し、YEPD培地上に離代培養した形質転換体から単離したUra+コロニーを実施例Iに述べたオーバーレイ方法によってカルボキシペオブチダーゼY活性に関してス

クリーニングした。対照コロニーに比べて赤色を発色しなかったコロニーをサブプロットハイブリッド形成による分析のために選択した。

### 3. 形質転換体からのDNAのサブプロットハイブリッド形成

選択した形質転換体からHoffmannとWinstonの方法[Gene, 57: 267-272 (1987)]を用いて、ゲノムDNAを単離した。各菌株からのゲノムDNAをBstEIIによって消化させた。この処理はpDR601又はpDR602のフラグメントの組込み領域を含むPEP4座の一部を避難させる。それ故、この領域のサイズはIGF-Uのゲノム中の形質転換用DNAの適切な組込みに特徴的である。消化されたDNAに対して0.8%アガロースゲル上で電気泳動を実施し、ニトロセルロースフィルターにこのDNAをプロットした。このフィルターをP. バストリスPEP4遺伝子の一部を含むpEP301の放射能標識した1.4kb XbaI/EcoRVフラグメントによって、標準方法を用いて、ハイブリッド形成した(Maniatis, T., Fritsch, E. F. 及びSambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 385-388頁, Cold Spring Harbor press, 米国ニューヨーク州、コールドスプリングハーバー(1982))。ハイブリッド形成は50%ホルムアミド、6XSAC、5XDenhardt溶液、20mM Tris-HCl、pH8.0、1mM EDTA、0.1%SDS及び100μg/ml サケ精子DNAを含む濃度で37°Cにおいて実施した。次にフィルターを1×SSC、0.1%SDS中で3回(1回の洗浄につき10分間)、次に0.5×SSC、0.1%SDS中で65°Cにおいて1時間洗浄した。比較用対照としては、P. バストリス菌株GS115、PEP4菌株、からのゲノムDNAをこの分析に含めた。

GS115からのゲノムDNAのBstEIIによる消化は4.4kbフラグメントを生じ、これはプローブ中に含まれるPEP4遺伝子の一部にハイブリッド化した。これに反して、このプローブは少なくとも二つの形質転換体、IGFU2601-5とIGFU2602-5からのDNAの5.9kbフラグメントにハイブリッド形成した。対照PEP4座に比べて大きいサイズの形質転換体PEP4座(6.9对4.4kb)は、その構造領域内にURA3遺伝子を有する非

機能性PEP4遺伝子による宿主PEP4遺伝子の置換と一致した。

これらの結果から、菌株IGFU2601-5とIGFU2602-5が遺伝子置換による宿主菌株IGF-UのPEP4遺伝子の破壊によって生ずる幾つかのPEP4菌株の例であると結論された。

### 実施例VI I: "POPOUT"ベクターを用いるPEP4ピキア菌株の形成

#### 1. P. バストリス遺伝子壁増ベクターpDL521の形成

"pop-in/pop-out"方法による宿主PEP4遺伝子の壁によるとP. バストリスのPEP4欠失(PEP4-)菌株の発生に、ベクターpDL521を用いた。この方法では、小欠失を含む欠陥PEP4遺伝子を宿主PEP4座に加え、PEP4座から機能性PEP4遺伝子を除去する(すなわち、pop-in/pop-out)。

pDL521は2工程で形成した。最初に、pDL323の2.2kb EcoRI/SacIフラグメントと、pPU205の2.2kb SacI/PstIフラグメントと、pUC19の2.7kb EcoRI/PstIフラグメントとを三方向結合(three-way ligation)によって結合させて、中間体プラスミドpDL501を形成した。これらの3フラグメントは次のようにして得た。P. バストリスURA3遺伝子を含むpPU205(図9)をPstIとSacIによって消化させた。URA3遺伝子を含む2.2kb PstI-SacIフラグメントをゲル単離し、DES1ペーパーを用いて精製した。完全PEP4遺伝子中に存在する0.5kb NcoIフラグメントを欠いた欠陥PEP4遺伝子を含むプラスミドpDL323(図13参照のこと)をEcoRIとSacIによって消化させた。欠陥PEP4遺伝子を含む2.2kbフラグメントをゲル単離させ、DES1ペーパーを用いて精製した。pUC19をEcoRIとPstIによって消化させた。3フラグメント(pUC19のEcoRI/PstI-消化フラグメント 0.02μg、pPU205の2.2kb PstI-SacIフラグメント 0.02μg、pDL323の2.2kb EcoRI/SacIフラグメント 0.02μg)の三方向結合で結合させた。この結合ミックスを用いて、大腸菌MC1061を形質転換させた。アンビシリントロポニンをNcoI消化コロニー-DNAの分析によっ

特表平6-506117 (16)

てスクリーニングした。正確に結合したフラグメントを pDL501 と名付けた。次に pDL501 を SacI によって消化させ、ウシ アルカリホスファターゼによって処理し、0.02 μg を SacI 消化 pEP202 から単離された 1.9 kb SacI フラグメント 0.02 μg と結合させ、DE81ベーパーを用いて精製した。これは pDL501 中の欠陥 PEP4 遺伝子の 3' 端にさらに PEP4 フランクイン配列を加えて、P. バストリス宿主 IGF-U の形質転換中の内因性 PEP4 遺伝子による組換えのためにさらに多量の相同配列を保証した。この結合ミックスを用いて、大腸菌株 MC1061 を形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーからの DNA を BglII と SpeI によって消化させ、pEP202 からの標記 SacI フラグメントの存在を示す特異的な 0.8 kb フラグメントの存在に関するスクリーニングした。正確なプラスミドを pDL521 と名付けた(図 16 参照)。

## 2. CS4-2のPDL521による形質転換

a. GB4-2の発生

pop-outプロセスによるPEP菌株の発生に宿主として、P.バストリスのURA3菌株が必要であった。ウラシルを補充した5-フルオロオロチシン培地(0.67%酵母塗素培基、2%寒天、2%グルコース、750ng 5-Foa/I及び48mg ウラシル/I)における普通的(general) HISPA P.バストリス宿主菌株GS115の10<sup>6</sup>細胞の直接培養によってURA3菌株を発生させた。30°Cにおける1週間のインキュベーション後に、平板上で増殖したコロニーを単離した。このHIS-Ura<sup>r</sup>菌株をGS4-2と名付けた。

#### b. GS4-2の形質転換とPEP4菌株の発生

プラスミド pDL521 を Not I による消化によって直接状化した。PEP4 遺伝子から配列が欠失して、この遺伝子を不完全にする部位の 5' に隣接して、Not I 部位を配置する。Not I フラグメントの両端は GS4-2 の内因性 PEP4 遺伝子の配列に相合であり、このことは PEP4 座における相同的組換によるフラグメントの組込みを促進する。

His-Ura<sup>r</sup>菌株GS4-2を、スフェロプラスチ方法に従って、Nal<sup>r</sup>

による消化によって直鎖化したpDL521-20μgによって形質転換された。形質転換体をそれらがウラシルを欠いた培地で増殖しうるか否かによって選択した。これらの形質転換体の12種を取り上げ、これらの形質転換体から單離した(実施例V, B, 3に述べるように)ゲノムDNAをSal Iによって切断し、0.8%アガロースゲル上で電気泳動を受けさせた。このDNAをニトロセルロースフィルターに移し、PEP4遺伝子の放射能標識1.2kb EcoRV/Xba I フラグメントによって調べた。ゲノムDNAのサンプロットハイブリッド化パターンに基づいて、PEP4菌に組込まれたpDL521を有するように見える2菌株、GS4-2521-3とGS4-2521-4とをさらに選択するために選んだ。これらの菌株はURA3マーカー遺伝子を含め、このマーカー遺伝子の片側には無傷の、完全なPEP4遺伝子を有し、他方の側には欠陥PEP4遺伝子(配列の~0.5kbを欠く)を有する。この形態のPEP4菌はPEP4遺伝子の2コピーの間の組換えを可能にし、PEP4遺伝子の一方とURA3遺伝子との脱離を生ずる(すなわち、pop-out)。この2種のPEP4遺伝子のいずれの一方もこの組換えイベントから脱離する(benighted)ことができる。2種PEP4遺伝子間の組換えが生ずるかどうか、また何時生ずるかを確認するために、菌株GS4-2521-3とGS4-2521-4とを5-FOAを含むYPD培地上で選択10倍希釈方法で培養した。Ura<sup>-</sup>菌株のみが5-FOAの存在下で増殖し、従って、このような培地での増殖が所望の組換えイベントの発生を実証する。5-FOA含有培地で増殖することができる菌株はPEP4遺伝子の2コピー間の組換えによって発生するウラシル要求型であった。Ura<sup>-</sup>コロニーは30°Cにおける1週間の培養後に5-FOA含有平板上に出現した:これらのコロニーの中の10コロニーはGS4-2521-3から誘導されたものであり、これらのコロニーの中の14コロニーはGS4-2521-4から誘導されたものである。

### 3. 形質転換体の特性化

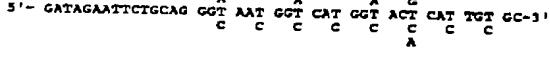
Uras<sup>r</sup>形質転換体コロニーの14コロニーを精製し、各々からゲノムDNAを形成し、EcoRIとEcoRVによって消化させ、0.8%アガロースゲル上で電気泳動を受けさせ、ニトロセルロース上にプロットし、P-Pアストリリ

PEP4 遺伝子の放射能標識 1. 2 kb XbaI/EcoR V フラグメントによってハイブリッド形成した。このようにして分析した 14 単離体の中の 7 単離体からの DNA は完全 PEP4 遺伝子に存在する ~0.5 kb の配列を欠いた欠陥 PEP4 遺伝子のみから成る PEP4 座と一致するハイブリッド化プロファイルを有した。これらの菌株の中の 2 種が GS4-2521-3/7 と GS4-2521-4/1 であった。

表施例V-1-1: P<sub>1</sub> バルトリのPRR-1遺伝子の一塩基のクローニング

プロテイナーゼB連伝子、PRB-1はS.セレビジエにおける被膜セルエンドプロテアーゼをコードする [Moehle等, Mol. Cell. Bio. 7: 4390-4399 (1987)]。同様の連伝子の一部をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 連伝子増幅方法を用いてP.バストリスからクローン化した (例えば、Gould等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1934-1938 (1989) を参照のこと)。種全体に維持される、プロテイナーゼBタンパク質の領域をコードするPRB-1連伝子配列への相同性を有する縮退オリゴスクレオチド (Moehle等, 上記文献) をP.バストリス PRB-1 DNAのPCR増幅にプライマーとして用いるために合成した。このオリゴスクレオチドは次の配列を有した:

## オリヨヌクレオチド 1:



## オリゴヌクレオチド 2:



増幅されたDNAフラグメントのシャトルプラスミドへのサブクローニングを促進するために、各オリゴスクレオチドはその5'末端に1個以上の制限エンドタクレアーゼ認識部位をも含んだ：オリゴスクレオチド2ではSphI部位、オリゴスクレオチド1ではPstI [とEcoRI] の両部位。

PCR反応培地はT. E. (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA) 2 μl中のP. バストリス (NRRL Y-11430株) ゲノムDNA 100 ngと、オリゴヌクレオチド 1 10 μlと、オリゴヌクレオチド 2 10 μlと、dGTP、dTTP、dATP及びdCTPの1. 25 mM溶液 16 μlと、10×緩衝液 (500 mM KCl、100 mM Tris-HCl、pH 8.3、15 mM MgCl<sub>2</sub>) 10 μlと、0.1%ゼラチンと、水 70 μlと、5 単位/μl TaqDNAポリメラーゼ 0.5 μlとから成るものであった。溶液を 94 °Cにおいて2分間加熱した。31回復復されるPCR 循環反応は96 °Cにおける2分間の変性と、50 °Cにおける1分間のアニーリングと、72 °Cにおける3、5分間の重合を含むものであった。

このPCRの生成物をアガロースゲル上の電気泳動に供し、オリゴヌクレオチド1と2に対応する位置間のPRB-1連鎖子の増幅生成物に予想されるサイズ(～500bp)のフラグメントをDE81ペーパー上で単離させ、EcoIとSphIによって消化させ、アガロースゲル上の電気泳動に供した。500bpフラグメントをDE81ペーパーによって単離させ、pUC19-10ngに結合させた、このpUC19はポリリンカーネー中でEcoIとSphIによって消化されて、直鎖化されたものである。この結合ミックスを用いて、大腸菌MC1061細胞を形質転換させた。アンビシリン耐性の形質転換体からの制限酵素消化プラスミドDNAを正確な500bp EcoI-SphIフラグメントの存在に関して分析した。1コロニーのみがpPRBPPと名付けられた、正確なプラスミドを含有した。このプラスミドのピキア部分の制限地図を図17に示す。

pPRBPPに含まれるP、バストリスPRB-1遺伝子のクローニング部分の配列をSangerジデオキシン方法を用いて発生させ(Sanger等、上記文献)、配列番号5に示す。P、バストリスPRB-1遺伝子のこの配列はS、セレビシエPRB-1遺伝子の配列に対して74.4%の相同性を有する。

#### 実施例IX: P<sub>1</sub>バストリスのPRB-1菌株の発生

P. パストリスの PRB-1 腫株の発生に用いるために、プラスミド pDR9-1 を形成した。このベクターは P. パストリスの PRB-1 腫株の内膜部分を

## 特表平6-506117 (17)

含み、これはP.バストリスのPRB-1菌株の形質転換に用いる場合に、宿主ゲノムにPRB-1座において組込まれ、PRB-1遺伝子の2種の不完全な非機能性コピーを形成する。ベクターpDR911はP.バストリスのURA3菌主導株に選択性マーカーとして用いるために完全な機能性P.バストリス URA3遺伝子をも含む。

### A. pDR911の形成

pPRBPP中のP.バストリスのPRB-1遺伝子フラグメントをPstIとSphIによるpPRBPPの制限酵素によって単離させた。この反応混合物を0.8%アガロースゲル上に負荷させ、0.5kbフラグメントをDE81ペーパーによって精製した。

この0.5kbフラグメントを直鎖状のプラスミドpPU203に、P.バストリスURA3含有pUCベースドプラスミドに結合させた(図8参照)。プラスミドpPU203をSphIとPstIによる開裂によって直鎖化し、~10ngをピキアDNAフラグメント~100ngと結合させた。この結合混合物を用いて大腸菌MC1061をアンビシリコン耐性に形質転換させた。アンビシリコン耐性コロニーを特徴的なフラグメントに関するPstI/SphI消化パターン-DNAの分析によってスクリーニングした。正確なプラスミドをpDR911と名付けた(図18参照)。

### B. GB4-2のpDR911による形質転換

P.バストリスのPRB-1菌株を形成するために、BglIIによる消化によって直鎖化されたpDR911による標準フェロプラスチ形質転換によって、GS4-2を形質転換させることができる。Ura+形質転換体からのDNAのサザンプロットハイブリッド化は、PRB-1座の破壊によって形成されるPRB-1菌株の確認を可能にした。形質転換体のプロティナーゼB活性分析[例えば、Jones等のGenetics 102: 665-677(1982)を参照のこと]は、菌株のプロティナーゼB欠失をさらに実証する。

### C. P.バストリスのprb-1, pep4菌株の発生

GS4-2521-4の单離体であるP.バストリスGS4-2521-4-5のpep4, ura3, his4菌株のPRB-1遺伝子(実施例VII参考)

配列表

#### 配列番号1:

##### (1) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 2032塩基対

(B) 配列の型: 標準

(C) 異の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(E) 配列の種類: cDNA

##### (F) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 236.. 1468

##### (G) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: 成熟ペプチド

(B) 存在位置: 236.. 1468

##### (H) 配列: 配列番号1:

```

GAATTCATAA TCGTGGATTG AGGTAGCTCG CGGGAAATAGG AATAGTGTTT TGGGGCGATT    40
AATCCGACCT GCGTATATG CTGAGTACCT TGACCGCTAA GCGGGCAACT ATTAGGAAACA    120
AAGGAAAGCCA CCTTTCCTTAA TCTGTAATCTG TGTGGAAAGG AGGATCTTTA CTGGAGAAC    180
TCTTAAACCAT TTGTGATCTT ACAGTTTCCAT TCTGTAATTTA CTGCTAAATTA ATTAAAG    228
ATA ATA TTT GAC GGT ACT ACC ATG TCA ATT GCC ATT GGT TTT CTC TCT    288
Met Ile Phe Asp Gly Thr Thr Met Ser Ile Asp Ile Lys Leu Ser Ser    1          8          10          18
ACT CTA GGT ATT GGT CCT GAA CCC AAA GTT CAT TCT GCT AAC ATG ATA CAC    334
Thr Leu Cys Ile Gly Asp Cys Asp Lys Val His Ser Asp Lys Ile His    20          25          30
AAG CAT CCA GTC TCA GAA ACT TTA AAA GAG GGC ATT TTT GGG GAG TAT    382
Lys His Pro Val Ser Glu Thr Ile Lys Glu Asp Asn Phe Oly Glu Tyr    15          40          45
CTC TCT CCT CTC GAA CAT AAA TAT GGT TCT CTC TTC AAC GAA GAA ATT    430
Val Ser Asp Leu Glu Xis Lys Tyr Val Ser Leu Phe Asn Glu Glu Asp    50          55          60
GCT TTG TCC AAC TCG AAT TTT ATC TCT CAG CAA GAA GAT GGT TTT GCG GTT    478
Ala Leu Ser Lys Ser Asp Met Ser Glu Asp Glu Phe Asp Val    65          70          75          80

```

GAA GCT TCG CAT GAT CCT CCA CTT ACA AAC TAT CTT AAC GCT CAG TAT Glu Ala Ser His Asp Ala Pro Leu Thr Asp Tyr Leu Asn Asn Cys Tyr 85 90 95	826
TTC AGT GAG GTA TCA TTA GGT ACC CCT CCA CAA TCG TTC AAC GGT ATT Phe Thr Glu Val Ser Leu Glu Thr Pro Pro Glu Ser Phe Lys Val Ile 100 105 110	874
CTT GAC ACA GGA TCC TCC AAT TTA TGG GTT CCT ADC AAA GAT TGT GCA Leu Asp Ile Glu Ser Ser Asp Leu Trp Val Pro Ser Lys Asp Cys Glu 115 120 125	622
TCA TTA GCT TCC TTC CAT GGT AACG TAT GAC GAT GAT GAG TGT TCT TGT Ser Leu Ala Cys Phe Leu His Asp Lys Tyr Asp His Asp Glu Ser Ser 120 125 130 140	870
ACT TAT AGG AGG ATT GGT ACT ADC TTT GAA ATT AGG TAT GCA TCC GGT Thr Tyr Lys Asn Glu Ser Ser Phe Glu Ile Asp Tyr Glu Ser Glu 145 150 155 160	718
TCC ATG GAA GGT TAT GTT CCT CAG GAT GTC GTC TTT GAA ATT GGG GAT TGT Ser Met Glu Glu Tyr Val Ser Glu Asp Val Leu Glu Ile Glu Asp Leu 155 160 170 175	768
ACC ATT CCC AAA GTT GAT TTT GCT GAG GCA ATT TTC GGG CCT CCT GCT TAT GAT Thr Ile Phe Val Asp Phe Ala Glu Asp Leu Ser Glu Pro Glu Leu 180 185 190 195	814
CCC TTC GCT TTT GGC AAA ATT GAC GCA ATT TTC GGG CCT CCT GCT TAT GAT Ala Phe Ala Phe Glu Lys Phe Phe Asp Glu Ile Leu Glu Leu Ala Tyr Asp 195 200 205 208	862
TCA ATA TCA GTA ATT AGT CCT CCT CCA ATT TAC AAC GGT TGT TGG GAA Ser Ile Ser Val Asn Lys Ile Val Pro Ile Tyr Lys Ala Leu Glu 210 215 220	810
TTA GAT CTC CCT GAC GAA CCA AAA TTT GGC TTC TAC TTD GGG GAT GAC Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro Lys Phe Ala Tyr Leu Glu Asp Thr 225 230 235 240	858
GAC AAA GAT GAA CCT GAT GGC ATT TGC GCA ATT TTT GCT CCT GGT GTC GAC Asp Lys Asp Glu Ser Asp Glu Lys Leu Ala Thr Phe Glu Glu Val Asp 245 250 255 260	1008
AAA TCT ATG TAT GAA GGA AAA ATC ACC TGC TTC CCT GTC AGA AGA AGG Lys Ser Lys Tyr Glu Glu Lys Ile Thr Trp Leu Pro Val Asp Arg Lys 265 270 275 280	1054
GCT TAC TGG GAG CTC TCT ATT GAT GGT GCA GGT TGC GGT TCC GAA TAT Ala Tyr Trp Glu Val Ser Asp Glu Val Glu Leu Glu Ser Glu Tyr 275 280 285 290	1102
GCT GAA TTC CAA AAA ACT GGT GCA GGC ATC GAC ACT GCA ACC TCA TTT Ala Glu Leu Glu Lys Thr Glu Ala Ile Asp Asp Thr Glu Ile Ser Leu 290 295 300	1150

特表平6-506117 (18)

ATT CCT TTC CCC AGT GGC CTA GCT GAA ATT CTC AAT GCA GAA ATT GGT Ile Ala Leu Pro Ser Gly Leu Ala Glu Ile Leu Asn Ala Glu Ile Gly 305 310 315 320	1198
GCT ACC AAC GGT TGG TCC GCA TAG GCT GTC GAC TGT GAC TGT AAC ACT AGA Ala Thr Lys Glu Tyr Pro Ser Gly Cln Tyr Ala Val Asp Cys Asp The Arg 325 330 335 340	1246
GAC TCT TTO CCA GAC TTA ACT TTA ACC TTC GGC GGT TAC AAC TTG ACC Asp Ser Leu Pro Asp Leu Thr Leu The Phe Ala Glu Tyr Asn Phe The 340 345 350	1294
ATI ACT CCA TAT GAC TAT ACT TTO GAG CCT TCT GCG TCA TGT ATT AGT Ile Thr Pro Tyr Asp Tyr The Leu Glu Val Ser Gly Ser Cys Ile Ser 355 360 365 370	1342
GCT TTC AGC CCC ATG GAC TTT CCT GAA CCA ATA GGT CCT TTO GCA ATC Ala Phe The Pro Met Asp Phe Pro Glu Pro Ile Gly Pro Leu Ala Ile 370 375 380	1390
ATT GGT GAC TCG TTC TGC AGA AAA TAT TAC TGA GCA GGT TAT GAC CTA GGC Ile Gly Asp Ser Leu Arg Lys Tyr Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Gly 385 390 395 400	1438
AAA CAT CCA GTC GGT TTA GCG ATT TAA GCGCAGAAA TAAAGCTTGC Lys Asp Ala Val Ser Leu Ala Lys Ser Ile 405 410	1486
TGAGCTGAACT TATTTGGTT ATTATTCAGG TGCTCAAGAT CTAGGAAATA TATGTTTGG TATTTTTT TACTTTTCTC CCTTAAACTC ATCTTCAGA CTGCTATCTC TGTGAGCTAC CTGACAGGCG CGCCATAGT GATATGGCTG ACTGCTCAAT CAACATTGCG CTCGCTCCATT CATAGGGCTA TAAGAGACCC ACCTCTCTCT CTTTAAATT CTCTCTAAC TUTTGAGAAA ATATCTCTCC AACGAAACATC CAGTTAAATC CTATGCCGTT GGTACTAAA GGTATGCTAT GGTGGTATAT AGTTTTCTAT TTACCTTTTCT ACTATCTACT TTACAGAGG AGGACGCTCT TTCTCAAGAT CCAGATAGGA CTAACTACTG GAGGAGCTTG GGTGCTTATT TGGGTGAAAG GCACTGGCTT ACAGTAAAGG AACAGTATTCG CGATGATGAA GATGCTGGT CTGCTTTCC TTTGTGCAAC TCTCATTTCA GAACTTATCG CTGGGAGAG CTCGCACTAG CTGGCAUTGCG ACAC	1448 1508 1568 1628 1688 1728 1788 1848 1908 1968 2028 2082
	3032

配列番号2:

(1) 配列の特徴:  
 (A) 配列の長さ: 410アミノ酸  
 (B) 配列の型: アミノ酸  
 (D) トポロジー: 環状  
 (E) 配列の種類: タンパク質  
 (ii) 配列: 配列番号2:

Met Ile Phe Asp Gly Thr Thr Met Ser Ile Ala Ile Gly Leu Leu Ser  
1 5 10 15  
Thr Leu Gly Ile Gly Ala Glu Ala Lys Val His Ser Ala Lys Ile His  
20 25 30  
Lys His Pro Val Ser Glu Thr Leu Lys Glu Ala Asn Phe Gly Gin Tyr  
35 40 45  
Val Ser Ala Leu Glu His Lys Tyr Val Ser Leu Phe Asn Glu Gin Asn  
50 55 60  
Ala Leu Ser Lys Ser Asn Phe Met Ser Cln Glu Asp Gly Phe Ala Val  
65 70 75 80  
Glu Ala Ser His Asp Ala Pro Leu Thr Asn Tyr Leu Asn Ala Gin Tyr  
85 90 95  
Phe Thr Glu Val Ser Leu Gly Thr Pro Pro Glu Ser Phe Lys Val Ile  
100 105 110  
Leu Asp Thr Gly Ser Ser Asn Leu Thr Val Pro Ser Lys Asp Cys Gly  
115 120 125  
Ser Leu Ala Cys Phe Leu His Ala Lys Tyr Asp His Asp Glu Ser Ser  
130 135 140  
Thr Tyr Lys Lys Asn Gly Ser Ser Phe Glu Ile Arg Tyr Gly Ser Gly  
145 150 155 160  
Ser Met Glu Gly Val Ser Glu Asp Val Leu Glu Ile Gly Asp Leu  
165 170 175  
Thr Ile Pro Lys Val Asp Phe Ala Glu Ala Thr Ser Glu Pro Gly Leu  
180 185 190  
Ala Phe Ala Phe Gly Lys Asp Glu Ile Leu Gly Leu Asp Asp Leu  
195 200 205

Ser Ile Ser Val Asn Lys Ile Val Pro Pro Ile Tyr Lys Ala Leu Glu 210 215 220
Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro Lys Phe Phe Tyr Leu Gly Asp Thr 225 230 235 240
Asp Lys Asp Glu Ser Asp Gly Ily Leu Ala Thr Phe Gly Glu Val Asp 245 250 255 260
Lys Ser Lys Tyr Glu Gly Lys Ile Thr Thr Leu Pro Val Arg Arg Lys 265 268 270 275
Ala Tyr Isp Glu Val Ser Phe Asp Gly Val Gly Leu Glu Ser Glu Tyr 275 280 285 290
Ala Glu Leu Glu Lys Thr Gly Ile Ile Ile Asp Thr Gly Thr Ser Leu 295 300 305 310
Ile Ala Leu Pro Ser Gly Leu Ala Glu Ile Leu Asn Ala Glu Ile Gly 315 320 325 330
Ala Thr Lys Glu Isp Ser Gly Glu Tyr Ala Val Asp Cys Asp Thr Arg 335 340 345 350
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Thr Leu Thr Phe Ala Gly Tyr Asn Phe Thr 360 365 370 375
Ile Thr Pro Tyr Asp Tyr Thr Leu Glu Val Ser Gly Ser Cys Ile Ser 385 390 395 400
Ala Phe Thr Pro Met Asp Phe Pro Glu Pro Ile Gly Pro Leu Ala Ile 405 410 415 420
Ile Glu Asp Ser Phe Leu Arg Lys Tyr Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Glu 425 430 435 440
Lys Asp Ala Val Gly Leu Ala Lys Ser Ile 445 450

配列番号3:

(1) 配列の特徴:  
 (A) 配列の長さ: 2688塩基対  
 (B) 配列の型: 核酸  
 (C) 錠の数: 不明  
 (D) トポロジー: 不明  
 (E) 配列の種類: cDNA  
 (ii) 特徴:  
 (A) 特徴を表す記号: CDS  
 (B) 存在位置: 643.. 1431  
 (iii) 特徴:  
 (A) 特徴を表す記号: 成熟ペプチド  
 (B) 存在位置: 643.. 1431  
 (iv) 配列: 配列番号3:

CTGGAGAAAT CGGGAGATAA CCACCTTGA GAATTCTGAT AGAGTCACTT 40  
TACAAATGCC ATCATGGCTTAC AGGATGAAAG CAGTGTGTTG TGGAGCTAA CGATTGAAAT 120  
GATGGAGAAAG ACTAGTAAAGA TTAATGAGCTT GTTCAGAGAA AGCTTGAAAGT AGTCTGAC 180  
ATAGAACCTT ATGATCACAA AAATAGGGGTTT AMGCTCTTAG CTGTTGCACT ATAAAGTTGT 240  
TTTGTGTTG GAAACCTTGA CCACACTCTC CACTGTCGTT GAGGAGCTT TGTGCACT 300  
TGTTGAAGCA GCCTTCTCC TTAGAGTCGA ACTTGTTGA TGTAAAGCA TTGACACAGT 360  
CTGTAACAAAC TTTCCTTACG AAATGGGATG AAAGGGCTTC ATTTGGTTT 420  
GTTCAGACAG TTTCCTGAGC TTCTGTTGTT CTTAGGGCTT CATGGCTGCT ATTTGGTGT 480  
CTACTGCTT GGCTGAGAGT TACGACTTGC TCTCTCTGTT ACCAGTTTTT GTCAGSATTG 540  
AGAGAAAAG TTTTTGGACG GATAGACCTTC GCACTTACG TTGGCATGTA TCCACTCTAA 600  
TGAGTAAACA TCAACTCTGAT CAAGGGATA GATACTTGA CA ATG CCT CGC AGT  
Met Ala Arg Ser 664  
1  
TAT GCC GAC AGA GCA ATT ACT CAT CTA CCT GTG GCA GCA GCA CTC  
5 10 15 20  
Phe Ala Glu Arg Ala Asn Thr His Glu Ser Pro Val Ala Arg Arg Leu  
25 30 35 40

GTC AGA AGA ACT AAA GAA TTA TTG GAG CTT CTA GAT AAA TTG GCG CGA Val Arg Thr The Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Leu Gly Pro 60 48 80	786
TTC ATC TGT TGG GGC AGC ACT CAT ATC GAC ATA ATT GAT GAG GTC YTC AGG Phe Ile Cys Leu His Lys Thr Ile Ile Asp Ile Asp Phe Thr The 55 50 55	846
TAT GAT GCA ACT ATT CTG CCT TTA TTG GAA CTA TCA AAC AAA CAC AAS Tyr Asp Glu Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Lys Lys His Lys 70 75 80	886
TTC TTA ATT TTT GAG GAC AGA AAD TTC GCT GAT ATA GCG AGC AAC GTC Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ile Asp Lys His The Val 55 50 55 100	942
AAG CAT GAA TAT CAR GCA GGT GTC TAC AAC ATT GCA CAA TGG GCA GAT Lys His Glu Tyr Glu Asp Glu Val Tyr Lys Ile Asp Glu Trp Asp 105 120 115	990
ATT ATC ATT ATT GCT CAT GOT GTC ATT GCT AGT GGA ATT GCA AAC GTC Ile Thr Asn Ile His Glu Val Ile Glu Ser Glu Ile Val Lys Glu Leu 120 125 130	1038
AAG GAG GCA GCC ACT GAG AGA ACA GAT CAA GCA AGG GCA CTA TTO ATG Lys Glu Asp Asn The Glu Thr The Asp Glu Pro Arg Glu Leu Met 135 140 145	1086
TTC GCT GAA CTG TCG TCA AAC GCA TCA ATT GCT GAT GOT AAC TAC ACC Leu Asp Glu Leu Ser Ser Lys Glu Ser Ile Asp His Lys Tyr The 150 155 160	1134
GAA GAA ACT GTC GAA ATT GCA AAA TCA GAC AAC GAA TTC GTC ATT GCG Glu Glu Thr Val Glu Ile Asp Lys Ser Asp Glu Phe Val Ile Glu 165 170 175 180	1182
TTT ATT GCT CAA ATT TCT ATO GGA GGA CAA GAT GAA GGG TTC GAT TOG Phe Ile Asp Glu Asn Ser Met Glu Glu Asp Glu Glu Phe Asp Ile 185 190 195 200	1230
ATT ATT ATC AGA CCA GOT GTT GCT TCG GAT GAC ACT GGT GAT OCT GTC Ile Ile Met Thr Pro Glu Val Glu Asp Asp Thr Glu Asp Asn Leu 205 205 210	1278
GCG CAA CAA TAT CGA AGC ACT GTC AGT CAA GTC ATT TCC ACT GGC ACT GAC Gly Glu Glu Tyr Asp The Val Ser Glu Val Phe Ser Thr Glu The Asp 215 220 225	1326
ATC ATA ATC GTC GOT GGT GCT TGG TTT GGC AAG AAC GAA GAT CCC TTA Ile Ile Ile Val Glu Arg Glu Phe Glu Lys Glu Arg Asp Pro Leu 230 235 240	1374
AAA GAA GOT GAA CGG TAT AGA AAA GOT GGG TGG GAA GOT FAC CAA ATT Lys Glu Glu Arg Tyr Arg Lys Glu Asp Glu Glu His Tyr Glu Asn 245 250 255 260	1422
ATT CTG AGG TAAATTACAGA GTATOTACAG CGGATCAATT GTTTCCGGCG Ile Leu Arg	1471

## 配列番号4 :

(1) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ : 263 アミノ酸

(B) 配列の量 : アミノ酸

(C) トポロジー : 蛋発状

(D) 配列の種類 : タンパク質

(E) 配列の種類 : タンパク質

(F) 配列 : 配列番号4 :

```

Met Asp Arg Ser Tyr Asp Glu Asp Asn Thr His Glu Ser Pro Val
    1      2      3      4      5      6      7      8      9      10      11      12
Asp Arg Arg Leu Phe Asp Leu Met Glu Glu Lys Glu Ser Asn Leu Cys
    13      14      15      16      17      18      19      20      21      22      23      24
Asp Ser Val Asp Val Arg Thr Thr Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp
    25      26      27      28      29      30      31      32      33      34      35      36
Lys Leu Glu Pro Phe Ile Cys Leu Asp Lys Thr His Ile Asp Ile Ile
    37      38      39      40      41      42      43      44      45      46      47      48
Asp Asp Phe The Tyr Asp Glu Thr Ile Leu Pro Leu Leu Glu Ser
    49      50      51      52      53      54      55      56      57      58      59      60
Lys Lys His Lys Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Asp Asp Ile
    61      62      63      64      65      66      67      68      69      70      71      72
Gly Asn Thr Val Lys His Glu Tyr Glu Glu Val Tyr Lys Ile Asp
    73      74      75      76      77      78      79      80      81      82      83      84
Gln Trp Asp Ile Thr Asn Asp His Glu Val Ile Glu Ser Glu Ile
    85      86      87      88      89      90      91      92      93      94      95      96
Val Lys Glu Leu Lys Glu Asp Asp Thr The Glu Thr The Asp Glu Pro Arg
    97      98      99      100      101      102      103      104      105      106      107      108
Gly Lys Tyr The Glu Glu Thr Val Glu Ile Asp Lys Ser Asp Lys Glu
    109      110      111      112      113      114      115      116      117      118      119      120
Phe Val Ile Cys Phe Ile Asp Glu Asn Ser Met Glu Glu Asp Glu
    121      122      123      124      125      126      127      128      129      130      131      132
Gly Phe Asp Trp Ile Ile Met Thr Pro Glu Val Glu Leu Asp Asp Thr
    133      134      135      136      137      138      139      140      141      142      143      144

```

```

Gly Asp Asn Leu Glu Glu Glu Tyr Arg Thr Val Ser Glu Val Phe Ser
    210      211      212      213      214      215      216      217      218      219      220
Thr Glu The Asp Ile Ile Val Glu Arg Glu Leu Phe Glu Lys Glu
    225      226      227      228      229      230      231      232      233      234      235
Arg Asp Pro Leu Lys Glu Glu Asp Tyr Arg Lys Asp Glu Ile Glu Trp Glu
    245      246      247      248      249      250      251      252      253      254      255
Ala Tyr Glu Asn Ile Leu Arg
    260

```

特表平6-506117 (20)

記列番号5:

(1) 記列の特徴:

- (A) 記列の長さ: 555 基塩対
- (B) 記列の型: 植物
- (C) 頻の数: 不明
- (D) トポロジー: 不明

(2) 記列の種類: c DNA

(3) 特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 3...554

(4) 特徴:

- (A) 特徴を表す記号: 成熟ペプチド
- (B) 存在位置: 3...554

(5) 記列: 記列番号5:

```

CA ATT CTC CAC GGA AAC GGC CAC GGT ACA CAT TGT GCT GAT ACC ATT
Ile Leu Glu Gly Asn Glu Gly Thr His Glu Asn Glu Gly Thr Ile
1          5           10          15
GCT TCT GAA AGC TAC GGT GTC GCG AAC AGC CCT AAT GTT CCT GCG ATC
Asp Ser Glu Ser Tyr Glu Val Asp Lys Asn Asn Val Val Ile
20          25           30
AAG GTC TTG AGA TCT ATT CGT TCT GGT TCC ATG TCA GAT GTC CTC AAC
Lys Val Leu Arg Ser Asn Glu Ser Glu Ser Met Ser Asp Val Leu Lys
35          40           45
GAT GTC GAC TAT CGG ACC CAA TCC CAC TTG GAT GCT GTC AAA AAC GGC
Gly Val Glu Tyr Asp Thr Glu Ser His Leu Asp Asn Val Lys Lys Glu
50          55           60

```

残基	位置	残基	位置	残基	位置	残基	位置	残基	位置
Arg	1	Arg	5	Cys	10	Ile	15		60
Lys	65		70		75		80		85
Leu	90		95		100		105		110
Asp	115		120		125		130		135
Thr	140		145		150		155		160
Ser	165		170		175		180		185
Asn	190		195		200		205		210
Gln	215		220		225		230		235
Ala	240		245		250		255		260
Gly	265		270		275		280		285
Asn	290		295		300		305		310
Asp	315		320		325		330		335
Asn	340		345		350		355		360
Asp	365		370		375		380		385
Asn	390		395		400		405		410
Asp	415		420		425		430		435
Asn	440		445		450		455		460
Asp	465		470		475		480		485
Asn	490		495		500		505		510
Asp	515		520		525		530		535
Asn	540		545		550		555		560

記列番号6:

(1) 記列の特徴:

- (A) 記列の長さ: 184 アミノ酸
- (B) 記列の型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 環状

(2) 記列の種類: タンパク質

(3) 記列: 記列番号6:

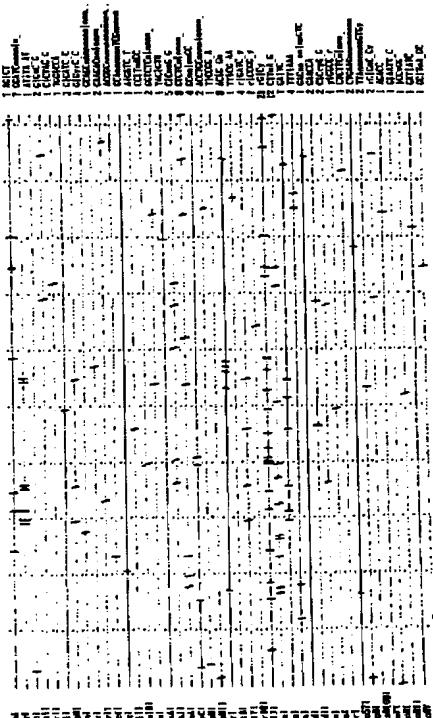
```

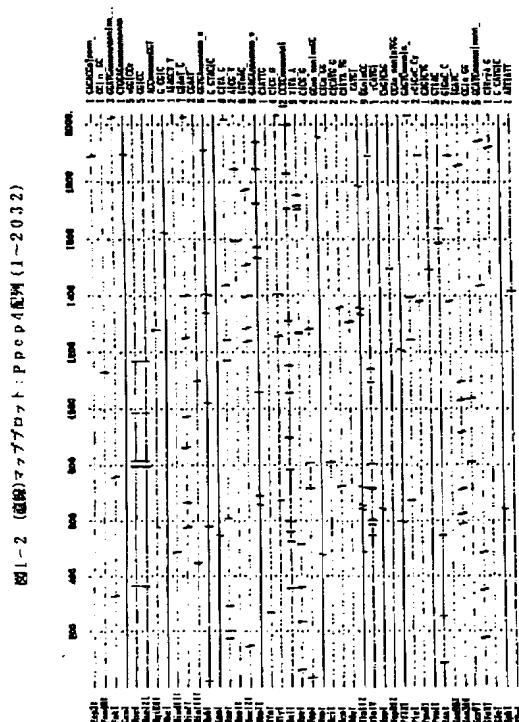
Ile Leu Glu Asn Glu Gly Thr His Cys Asp Gly Thr Ile Asp
1          6           10          15
Ser Glu Ser Tyr Glu Val Asp Lys Asn Asn Val Val Ile Ile Lys
20          25           30
Val Leu Arg Ser Asn Glu Ser Glu Ser Met Ser Asp Val Leu Lys Glu
35          40           45
Val Glu Tyr Asp Thr Glu Ser His Leu Asp Asp Val Val Lys Lys Glu
50          55           60
Lys Lys Phe Lys Glu Asp Thr Asn Asn Met Ser Leu Glu Glu Glu Glu
65          70           75          80
Ser Pro Asp Leu Asp Leu Asp Asn Asn Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
85          90           95          100
His Phe Asp Asp
100         105          110          115
Ser Phe Asp Asp
115         120          125          130
Ser Asp Asp
135         140          145          150
Phe Asp Asp
155         160          165          170
Asp Asp
175         180          185          190
Cys Leu His Asp Ser Leu Asp
195

```

溶媒(内部に複数)

(結果)マッププロト: Ppepp639 (1~2032)





卷之二 (續) : 第一章 (1~2032)

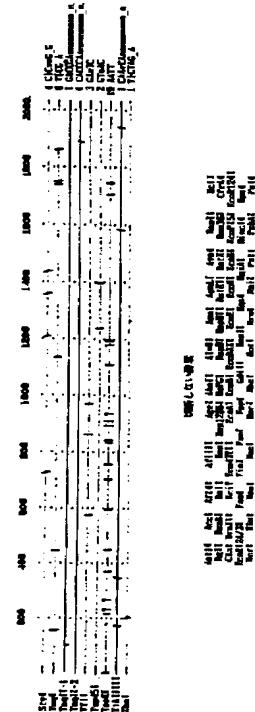


図1-3 (左側)マガナプロダクト: PPeP4E9(1~2032)

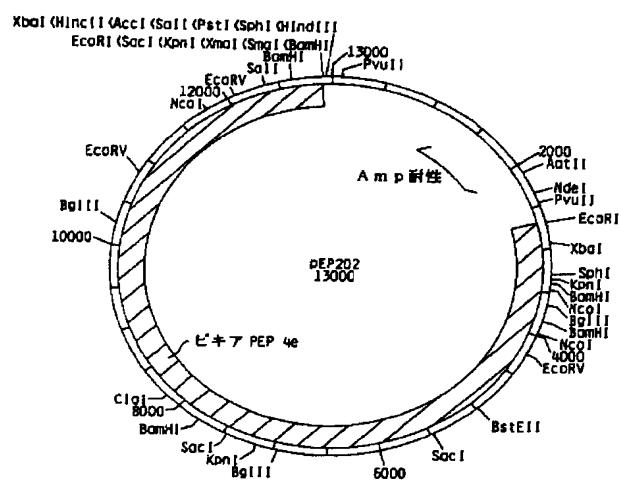


圖 2

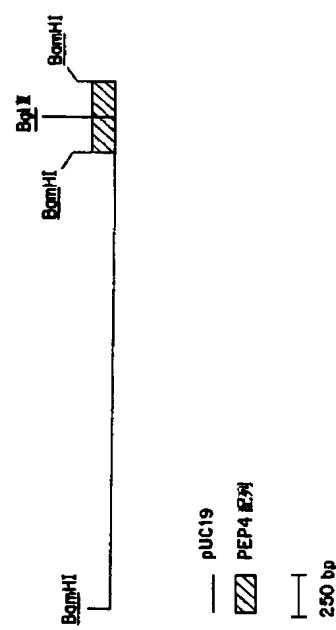


図3 PEP205の構造式

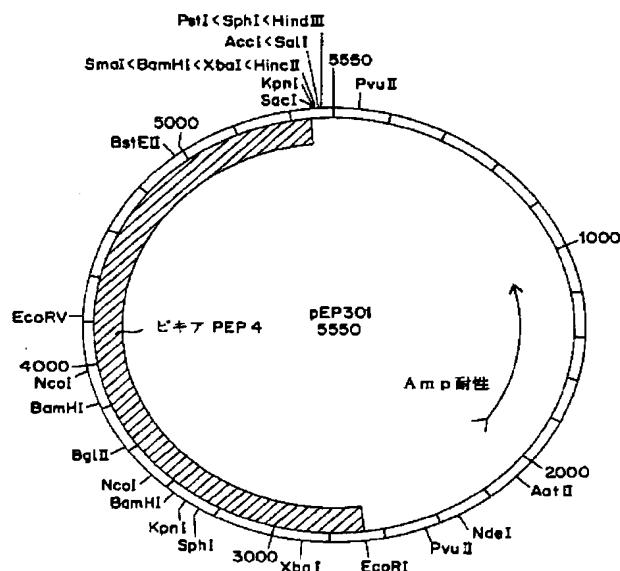


図4

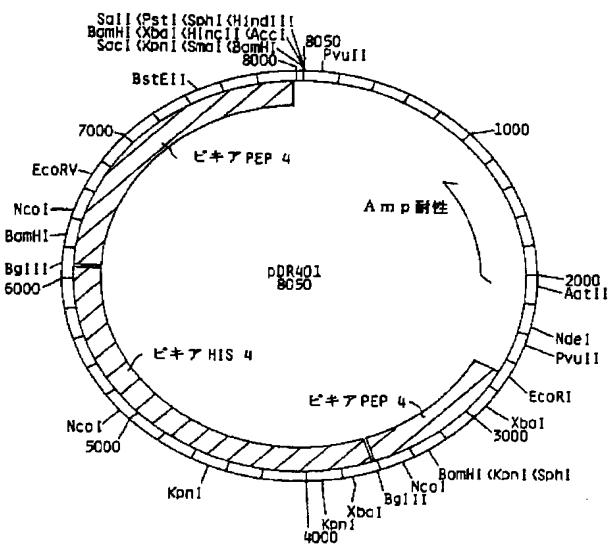


図5

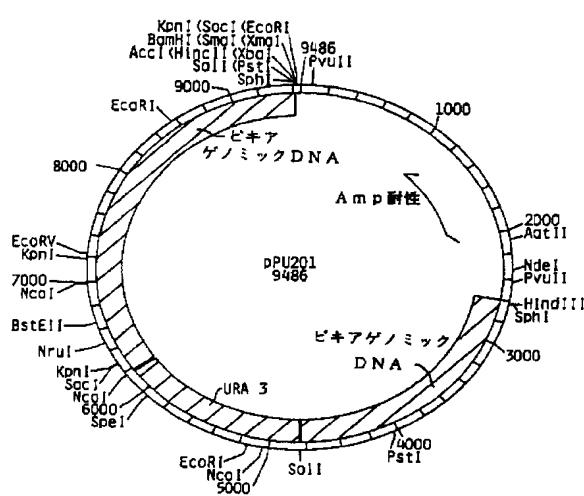
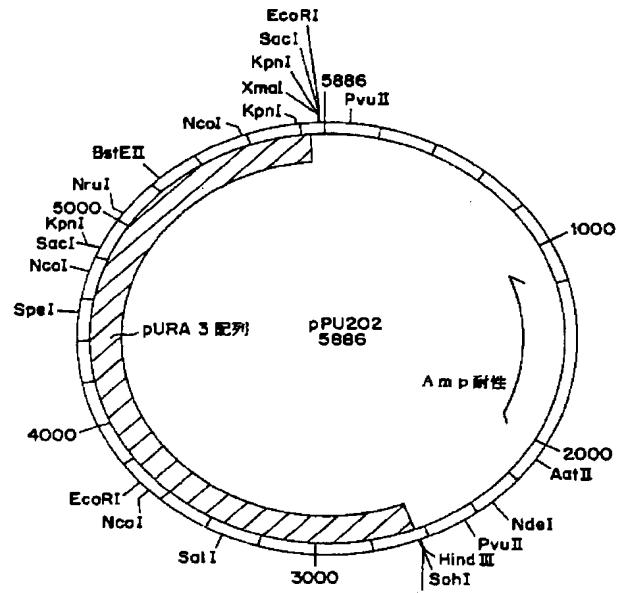


図6



プラスミド地図: pPU202 配列: 1-5886

図7

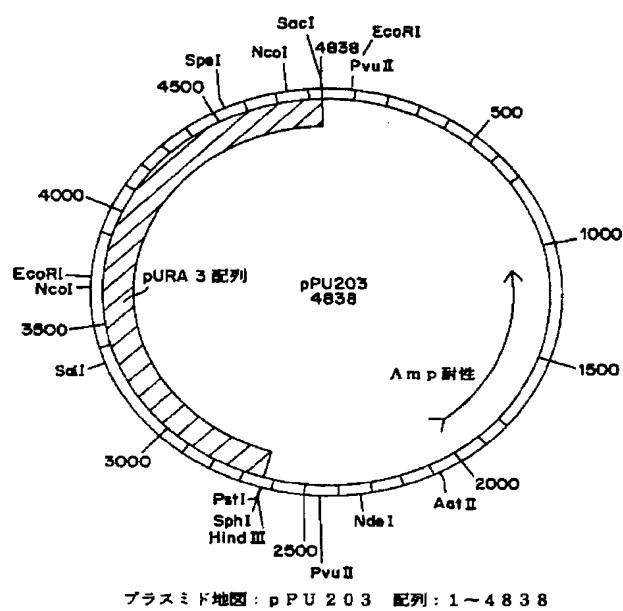


図8

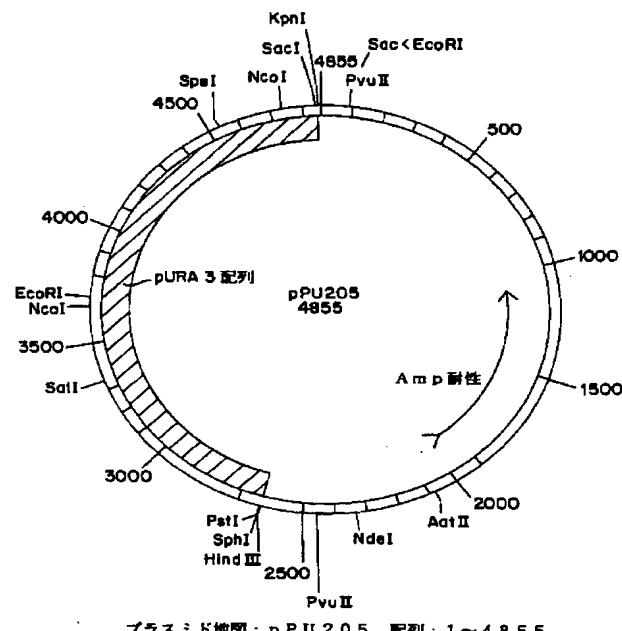


図9

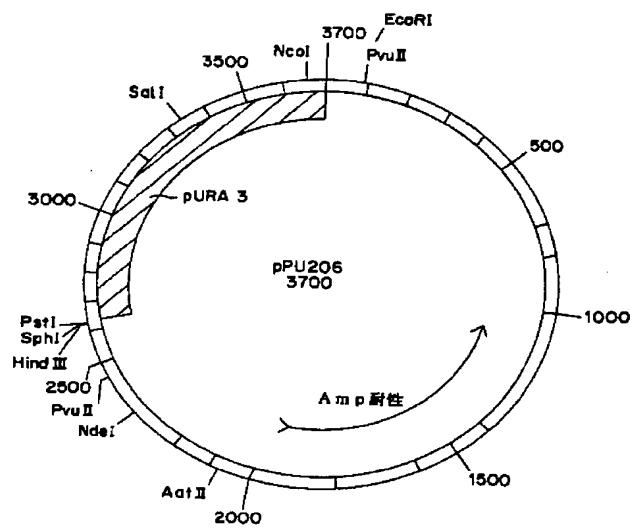


図10

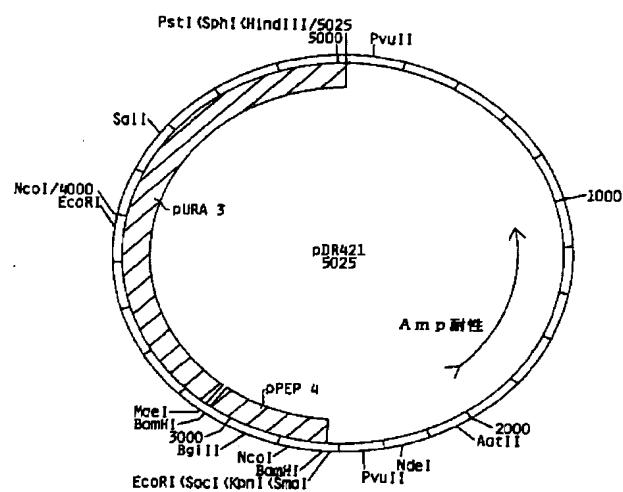


図11

図12-1 (電鏡)マッププロット: Pp-Ura3配列(1~2688)

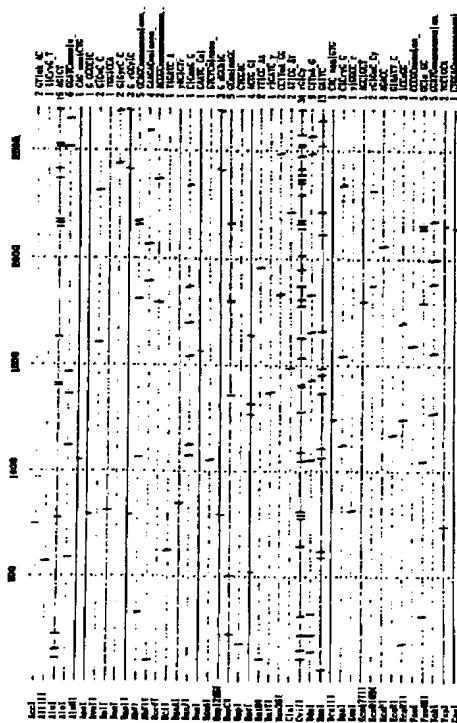


図12-2 (電鏡)マッププロット: Pp-Ura3配列(1~2688)

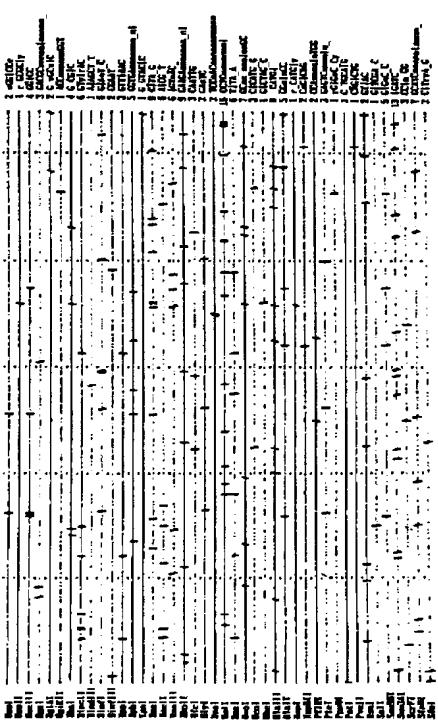


図12-3 (電鏡)マッププロット: Pp-Ura3配列(1~2688)

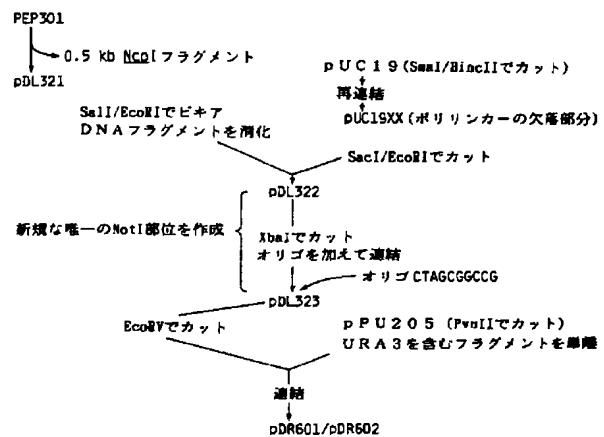
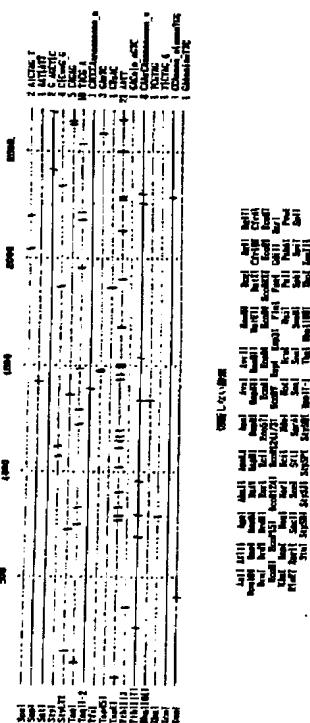


図13

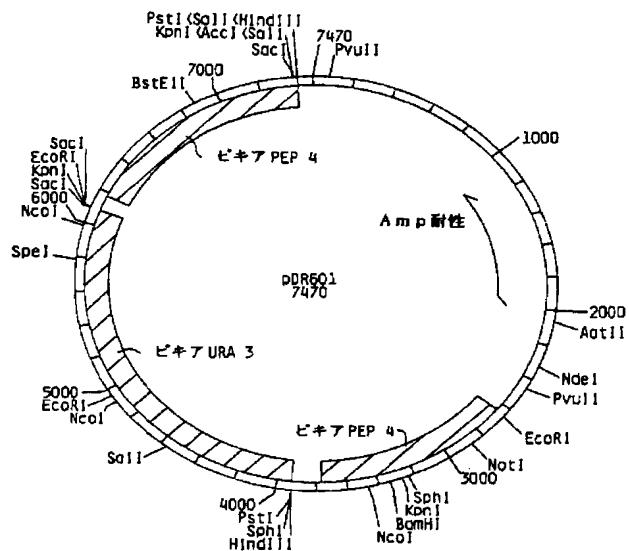


図 1.4

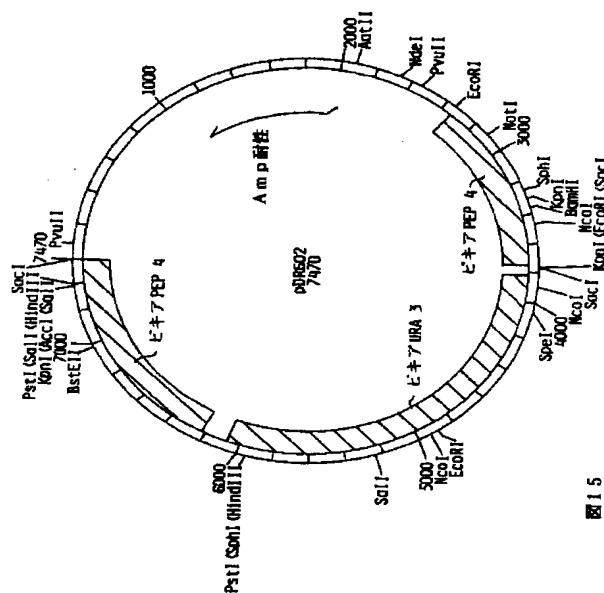


図 1.5

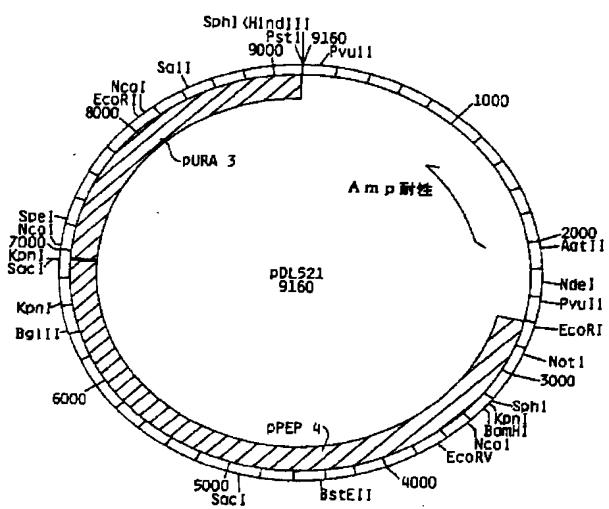
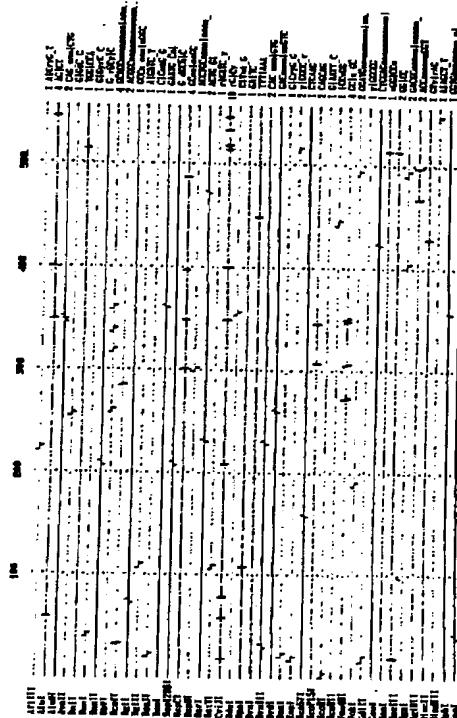
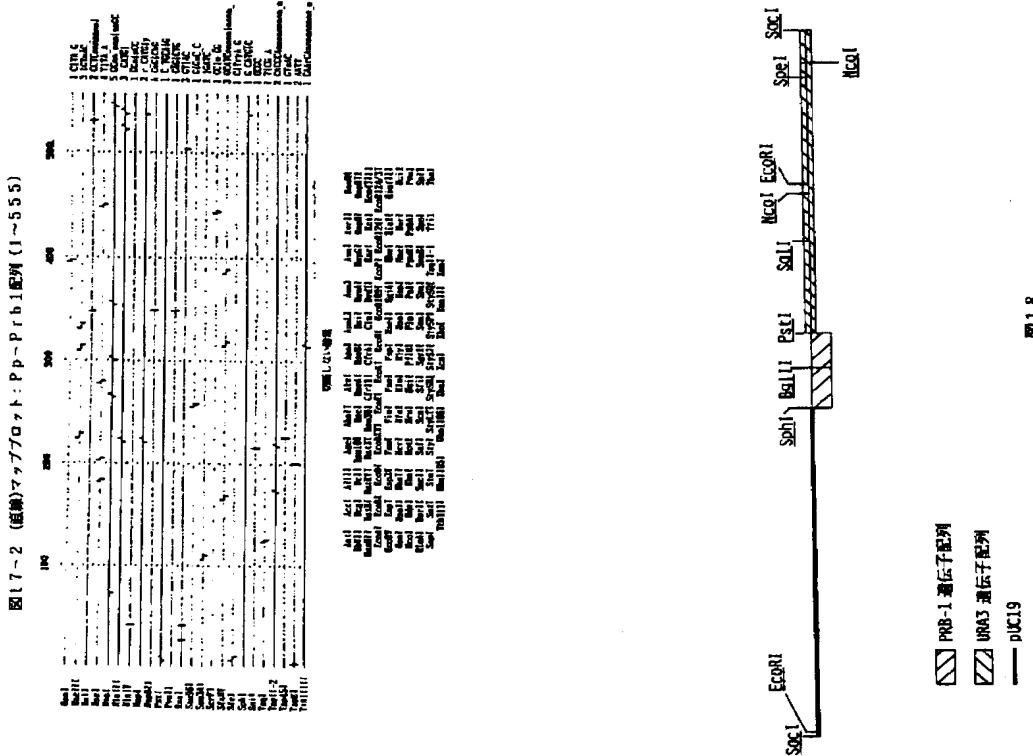


図 1.6

図 1.7-1 (左側)マッピング: Pp-Prb1型 (1~555)





補正書の翻訳文提出書  
(特許法第184条の8)

平成 5年 9月14日

特許庁長官 麻生 渡 殿

## 1. 特許出願の表示

PCT/US92/02521

## 2. 発明の名称

## ピキア (Pichia) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子およびその使用

### 3. 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国カリフォルニア州92037、ラ・ホーラ  
コスツ・ブルバード。サウス 505  
名 称 ザ・ソーカ・インスティチュート・バイオテクノロジー/  
インダストリアル・アンド・エンジニアリング・インコーポレーテッド

#### 4. 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル 206区  
電話 3270-6641~6646  
氏名 (2770) 井理士 道 雄恭三

## 5. 指正書の提出日

平成 4年12月15日

## 6. 受付審査の目標

### (1) 情正書の翻訳文

1 / 1



### 3・4条補正書の翻訳文

明加音

## ピキア (Pichia) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子およびその使用

技術分野

本発明は組換えDNA技術に関する。一つの特徴の態様において、本発明は組換え技術を用いて產生される酵母株および蛋白質分解プロセシングに含まれている蛋白質、ならびに独立栄養性マーカー蛋白質をコードしているDNAに関する。別の態様において、本発明は組換え産物、特に蛋白質分解されやすい組換え蛋白物を產生する方法に関する。

附录

多くの組換え遺伝子の生産のためにピキア (*Pichia*) に基づく発現系を良好に作動させるためにはピキア (*Pichia*) のある種の蛋白質分解活性を減少または除去することが望まれるであろう。これにより、組換えピキア (*Pichia*) 宿主中のプロテアーゼ感受性遺伝子の分解の可能性が減少するであろう。分解の可能性の減少によりそのような遺伝子を実質的に無効の形で発現および回収する能力が保証されるであろう。

新規えんじにより生産される生成物の蛋白質分解の問題を減少または除去させるために種々の技術が応用できる。例えば、プロテアーゼ活性が阻害されるように組換ええんじが増殖する条件を修正することができる。例えばこのことは種々のプロ

ロテーゼ作用を阻害するのに十分なように培地のpHを調節することにより達成される。しかしながら、この方法はある種の組換え生成物を発現する宿主生物の能力に（ならびに発現するやいや、得られた生成物の安定度にも）影響を与えるであろう。さらに、この方法は細胞外蛋白質分解に対する効果のみに制限される。

また、組換えにより生産された蛋白質分解に敏感な生成物を分解する蛋白質分解活性に關する宿主生物のプロセシング酵素のいくつかまたは全部を修飾または除去しようとする試みがある。しかしながら、直接生物における蛋白質分解過程は非常に複雑であり連鎖が保たれている。従って、蛋白質分解プロセシング経路に含まれている1つまたはそれ以上の酵素の除去および/または修飾が宿主の生存度に、および/または組換えにより生産された生成物の安定度に対して影響を及ぼすかどうかを予測するのは不可能である。

酵母サッカロマイセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のいくつかの蛋白質分解活性が特徴付けられている。例えば、プロティナーゼAは *S. cerevisiae* PEP4遺伝子によりコードされている。プロティナーゼAは液胞性アスパルチル プロテアーゼであり、自己活性化ならばにカルボキシペプチダーゼYおよびプロティナーゼYのような別の液胞性プロテアーゼを統合して活性化できる。カルボキシペプチダーゼYはこの酵素のプロティナーゼA導介蛋白質分解プロセシング前では完全に不活性であるらしいが、プロティナーゼB (*S. cerevisiae*) のPRB-1遺伝子によりコードされている) はその前駆体形(酵素がプロティナーゼ媒介プロセシングを受ける前に存在する形)で約50%生物的に活性であると報告されている。

蛋白質分解活性を欠く *S. cerevisiae* および系状菌が異種ペプチドの組換え発現に使用されてきた。しかしながら、これらの生物はメチロトローフ酵母ピキア (*Pichia*) とは本質的に異なる。サッカロマイセス (*Saccharomyces*)、アスペルギルス (*Aspergillus*) およびピキア (*Pichia*) 間に多くの代謝的および生理的相違が存在するため、これらの種々の生物の蛋白質分解プロセシング系は同じである。

別の実施態様に従うと、ピキア (*Pichia*) オロチジン-5'一リン酸デカルボキシラーゼ蛋白質 (*URA3* 遺伝子) をコードしている遺伝子が提供される。この遺伝子の有効性は、ピキア (*Pichia*) の株 (*Ura+*) と組合合わせて、蛋白質分解活性が欠損したピキア (*Pichia*) の組換え株の產生に使用するための選択系が提供されることである。そのような *Ura+* 株はまだ、種々の異種生成物の組換え発現に使用される組換えDNA作製物による形質転換の宿主としても有用である。

#### 図面の簡単な説明

図1はプラスミドpEP202の制限地図である。  
 図2はプラスミドpEP205の制限地図である。  
 図3はプラスミドpEP301の制限地図である。  
 図4はプラスミドpDR401の制限地図である。  
 図5はプラスミドpPU201の制限地図である。  
 図6はプラスミドpPU202の制限地図である。  
 図7はプラスミドpPU203の制限地図である。  
 図8はプラスミドpPU205の制限地図である。  
 図9はプラスミドpPU206の制限地図である。  
 図10はプラスミドpDR421の制限地図である。

図11はpDR601およびpDR602の作製に使用された工程を要約している。

図12はプラスミドpDR601の制限地図である。  
 図13はプラスミドpDR602の制限地図である。  
 図14はプラスミドpDL521の制限地図である。  
 図15はプラスミドpDR911の制限地図である。

#### 発明の詳細な説明

本発明に従うと、ピキア (*Pichia*) 属の株の蛋白質分解活性に直接的にまたは間接的に影響する蛋白質をコードしている遺伝子を含む前記の株から得られた単離DNA断片が提供される。

本発明の別の実施態様に従うと、修飾されていない同じ種の宿主株に比較して

必要はない。實際、ピキア (*Pichia*) 内に存在する蛋白質分解活性の型に關しては現在ほとんど知られていない。

さらに、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) またはアスペルギルス (*Aspergillus*) と異なって、異種ペプチドの組換え発現に使用されるピキア (*Pichia*) 細胞は、典型的には高細胞密度で増殖され、それは少くとも一部には発酵過程の間の発泡を最少にする株を選択することにより可能である。そのような細胞の選択は培地内へ分泌される蛋白質の大きさを減少させて発泡を止める多量のエンドおよびエキソプロテアーゼを産生する細胞を選択することにより達成される。さらに、高細胞密度での増殖で異種ペプチドが高収率で得られるが、一方高細胞密度での増殖は酵母発酵の間に溶出するので、高細胞密度は培地内へのかなりの量の細胞物質(液胞性プロテアーゼを含む)の放出を伴う。従って、高細胞密度法における異種ペプチドの產生の間に、ピキア (*Pichia*) により產生され、分泌されたいくらかの異種ペプチドは實質的な蛋白質分解をうける。

従って、ピキア (*Pichia*) のプロテアーゼ欠失株を提供することおよびそのような株を発生させる手段を提供するのが本発明の目的である。異種蛋白質の発現のためのプロテアーゼ欠失株の使用もまた本発明の目的である。

#### 発明の概要

本発明に従うと、ピキア (*Pichia*) 属の種の蛋白質分解過程に含まれている遺伝子が単離され、特徴付けされた。そのような遺伝子の有効性とは、蛋白質分解感受性生成物の発現のための宿主として有用である蛋白質分解活性が欠失したピキア (*Pichia*) の株を発生させる手段を提供することである。

野生型ピキア (*Pichia*) 細胞と比較して、蛋白質分解活性を欠失させるために修飾されたピキア (*Pichia*) の株は、蛋白質分解感受性生成物をコードしている組換え細胞物の発現のための優れた宿主である。本発明で提供されるプロテアーゼ欠失宿主細胞中の低レベルの蛋白質分解活性と結合されたピキア (*Pichia*) 発現系を用いる高レベルの組換え生成物発現の利点は、蛋白質分解感受性生成物の產生のための非常に有効な発現系を提供することである。

蛋白質分解活性が欠失しているピキア (*Pichia*) 属の修飾株を作り出す方法が提供される、その方法は：

前記宿主株を上記遺伝子の修飾型(前記修飾はその遺伝子を機能的生成物が產生できないようにするか、または蛋白質分解活性に影響する遺伝子生成物の能力を変化させる)と接触させる(ここで前記の接触は前記宿主株のゲノム内への上記遺伝子の上記修飾型の部位特異的組込みに通じた条件下で実施され、前記部位特異的組込みは、蛋白質分解活性に影響する前記蛋白質をコードしている前記遺伝子の特定の位置で起こる)ことを含んでいる。

本発明のさらには別の実施態様に従うと、蛋白質分解活性が欠失したピキア (*Pichia*) 属の株が提供される。そのような株は色々な方法で產生できるが、現在そのような株を產生する良好な方法は上記の方法である。

本発明のさらには別の実施態様に従うと、蛋白質分解感受性組換え生成物の発現方法が提供され、前記方法は、前記蛋白質分解感受性生成物を蛋白質分解活性が欠失している上記ピキア (*Pichia*) 細胞中で発現させることを含んでいる。

本発明のさらには別の実施態様に従うと、オロチジン-5'一リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を含むピキア (*Pichia*) 属株から得られた単離DNA断片が提供される。

本発明のさらには別の実施態様に従うと、組換えDNA作製物を形質転換できる宿主としてのピキア (*Pichia*) 属の酵母細胞が提供される(前記宿主はオロチジン-5'一リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子が欠失している)。

本明細書で使用される術語「蛋白質分解活性」とは、蛋白質分解経路に含まれる酵素により示される1つまたはそれ以上の酵素活性を表わしている。蛋白質分解活性には、プロティナーゼA活性、プロティナーゼB活性、カルボキシペプチダーゼY活性、カルボキシペプチダーゼS活性、アミノペプチダーゼC活性、ジペプチジアミノペプチダーゼ活性、プロティナーゼD活性、プロティナーゼE活性などが含まれる。

本明細書で使用される場合、直接または間接的に酵母株の蛋白質分解活性に影響する蛋白質をコードしている遺伝子には、プロティナーゼをコードしている遺伝子またはプロティナーゼに作用する蛋白質をコードしている遺伝子が含まれる。

ここに使用される場合、蛋白質に作用する蛋白質とは、プロテイナーゼの活性を変化させるかまたは調節する蛋白質を表わしている。従って、例えば蛋白質分解活性に直接影響する蛋白質とはプロテイナーゼをコードしている蛋白質であり、蛋白質分解活性に間接的に影響する蛋白質とは蛋白質分解プロセシングにより蛋白質を活性化するまたは活性を増加させる蛋白質である。サッカロマイセス セレビジエ (Saccharomyces cerevisiae) プロテイナーゼはサッカロマイセス セレビジエ (Saccharomyces cerevisiae) の蛋白質分解活性に直接および間接的に影響を与える蛋白質の例である。

本発明の一つの実施態様に従うと、直接または間接的にピキア (Pichia) 属の株のカルボキシペプチダーゼY活性に少くとも影響を及ぼす蛋白質をコードしているピキア (Pichia) 遺伝子がピキア (Pichia) 属の一つの種から単離され同定された。この遺伝子は以後便宜上、この遺伝子およびS. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子の間のいくつかの類似性の存在に基づき、ピキア (Pichia) PEP4遺伝子と称される。しかしながら、ピキア (Pichia) 遺伝子およびサッカロマイセス (Saccharomyces) 遺伝子のタクレオチド配列は本質的には異なっていることを認識されたい。この遺伝子をコードしている配列を含む断片は種々の材料から簡単な操作により容易に得ることができる。そのような材料の一つはプラスミドPEP202 (国1参照) の約1.6Kbp EcoRI断片であり、もしくはプラスミドPEP301 (国3参照) の約2.7Kbp EcoRI-SacI断片である。

プロテイナーゼA遺伝子をコードしているDNAもまた提供される。本発明のプロテイナーゼA遺伝子は配列番号2に示したアミノ酸配列を参照することによりさらに特徴付けることができる。配列番号2に示されたものと本質的に同一のアミノ酸配列をコードしている任意の核酸配列を持つDNA、または相同的遺伝子の破壊のために有用であるような十分な相容性を持つDNAも本発明の実施に使用できる。上記のアミノ酸配列をコードしている核酸の例は配列番号1に示されている。

ピキア (Pichia) 属の株の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響を及ぼす蛋白質をコードしているピキア (Pichia) 遺伝子は、遺伝子の機能

的生成物を產生できないようにするために、または前記ピキア (Pichia) 属の蛋白質分解活性に影響を及ぼす遺伝子産物の能力を変化させるために種々の方法により修飾できる。当業者は上記遺伝子の修飾のために多くの方法があることを認めるであろう。例えば、遺伝子によりコードされている蛋白質のアミノ酸配列を修飾するためにコード配列に突然変異を起こすことができる。もしくは、コード配列の種々の部分を遺伝子から欠失させることができる。欠失は発現された生成物を非機能的にするだけで十分である(たとえまだそれが発現できいても)。従って、たった一つのタクレオチドが消失されても、残りのコード配列を読み替からはずすことにより、たとえ発現できいても生成物の機能を失わせることができる。もちろん、より大きな欠失は本質的に修飾された生成物を発現するようになり、およびそのような生成物は、無傷の遺伝子により產生される生成物と比較して非常に異なった蛋白質分解性を持っているであろう(もしかしたら)。さらに別の方法としては、問題とする遺伝子の読み替を破壊するようにコード配列内へ追加の配列を挿入でき、それにより、発現される生成物は劇的に変化され、または完全に発現されなくなるであろう。

ピキア (Pichia) 属の株の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響を及ぼす蛋白質をコードしているピキア (Pichia) 遺伝子の修飾特に特に都合の良い方法は前記ピキア (Pichia) 遺伝子内へ独立栄養性のマーカー遺伝子を挿入し、それによりピキア (Pichia) 遺伝子を破壊することである。そのような独立栄養性マーカー遺伝子はピキア (Pichia) またはサッカロマイセス (Saccharomyces) HIS4遺伝子、ピキア (Pichia) またはサッカロマイセス (Saccharomyces) ARG4遺伝子、ピキア (Pichia) またはサッカロマイセス (Saccharomyces) URA3遺伝子などから選択できる。

蛋白質分解活性を欠くピキア (Pichia) 株は種々の方法により調製できる。現在のところ好適な方法は、選した宿主中、本発明の遺伝子(この遺伝子は修飾されていない形ではピキア (Pichia) 属の株の蛋白質分解活性に、直接または間接的に影響を及ぼす蛋白質をコードしている)を修飾することから成る。もしくは、宿主株に無作為的な(即ち非選択的)突然変異を起こさせ、蛋白

質分解活性を欠く突然変異体を選択するためにスクリーニングを行う。

宿主中、本発明の遺伝子を修飾することにより蛋白質分解活性欠失株が產生される場合、そのような痕跡は例えば、蛋白質分解活性に影響する蛋白質をコードしている遺伝子(即ち標的遺伝子)の特定の座位での宿主のゲノム内の修飾遺伝子の部位特異的組込みに達した形質転換条件下で修飾遺伝子を導入することにより実現される。組込みは宿主の内在性遺伝子を置き換えるまたは修飾するであろう。酵母宿主の標的部位内への修飾遺伝子の導入に適合の良い方法は宿主内の天然の遺伝子の2つの別々の相同的な末端を持つ直鎖状DNA断片中に修飾遺伝子を包含させることである。こうすれば形質転換により、その発現生成物が蛋白質分解活性に影響を与える遺伝子の特定の部位で相同的組換えを起こすように方向付けられるであろう。

蛋白質分解活性を欠くピキア (Pichia) 株は上に記したような(即ち、その発現生成物が蛋白質分解活性に影響する遺伝子の特定の座位での部位特異的組込みにより、本発明の修飾遺伝子を導いた宿主内へ導入し、それにより、すべてまたは一部の修飾遺伝子内で内在性遺伝子のすべてまたは一部を置き換える)好適な方法で調製され、内在性遺伝子は破壊されているであろう。

ここで使用される場合、修飾遺伝子“破壊”とは標的生成物が生じないか、または変化した機能を持つ生成物を得るために遺伝子を最終的に生じさせる標的座位の操作を意味している。従って、付加された配列の存在(例えば独立栄養性マーカーの導入または読み替のシフトを起こす配列の導入により)、標的遺伝子からのタクレオチドの消失(例えば欠失により)、または標的遺伝子の他の突然変異により破壊をおこすことができる。蛋白質分解活性を欠くピキア (Pichia) 株を調製する好適な方法では遺伝子付加、遺伝子置換またはここで“ポップーイン-ポップーアウト”と称される付加および置換の組合せにより遺伝子破壊が達成される。遺伝子置換においては内在性標的遺伝子が標的座位から物理的に除去され、修飾遺伝子と置換される。このことは、標的遺伝子の5'および3'の各々の末端と相同的な末端を持つ直鎖状DNA片で宿主を形質転換することにより達成される。遺伝子付加では内在性標的遺伝子へ形質転換DNAが付加される。形質転換DNAの修飾遺伝子が変形される方法に依存して、遺伝子付加によ

り標的遺伝子の二つの非標的コピーやまたは標的遺伝子の一つの標的および一つの非標的のコピーが生じる可能性がある。二つのコピーの各々が内在性遺伝子の一部および形質転換DNAの一部から成り立っている。もし、遺伝子付加後に標的遺伝子の一つの標的性コピーが残っていたら、統一の標的遺伝子の二つのコピー間にによる相同的組換えによりそれを除去することができる。相同的組換えへと続く遺伝子付加の組合せ過程はポップーイン-ポップーアウト過程である。

ピキア (Pichia) 属の酵母を形質転換する方法ならびにそのような酵母細胞の培養に適用する方法は本分野では一般的なことである。上記の修飾遺伝子を含む構成物は、Cregg et al., Mol. Cell. Biol. 5: 3376 (1985) および米国特許第4,879,231号により記載されているスフェロプラスト技術またはピキア (Pichia) に適応させるために都合された【欧州特許出願第312,934号参照:米国特許第4,929,535号も利用できる】全細胞催化リチウム酵母形質転換系 [Ito et al., Agric. Biol. Chem. 48: 341 (1984)]によりピキア (Pichia) 細胞を形質転換する。スフェロプラストの発現および維持を必要としないので、しばしば全細胞催化リチウム法が便利である。スフェロプラスト法は一般的に形質転換の効率がより良い手段であるので、本発明の目的にはスフェロプラスト法が好適である。

上記の修飾遺伝子により形質転換される宿主ピキア (Pichia) 株は野生型ピキア (Pichia) 細胞であり、蛋白質分解活性の欠失遺伝子による形質転換により、減少した蛋白質分解活性でスクリーニングできることを当業者は認識するであろう。用いられる宿主株は所要の形質転換体の同定および選択を助けるために一つまたはそれ以上の欠損を持つことができる。

ピキア (Pichia) 株の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響する蛋白質をコードしている遺伝子の修飾での形質転換に使用される好適な宿主は、少くとも一つの独立栄養性マーカー遺伝子が消失した株である。そのような宿主を本発明の標的形および独立栄養性マーカー遺伝子で同時に形質転換することにより形質転換DNAが取り込まれた(従って宿主の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響する蛋白質をコードしている遺伝子の破壊形を持っています)。

## 特表平6-506117 (29)

株の迅速な選択が可能になるため、前記の宿主生物の使用が好適である。

本発明の実施に有用な独立栄養性マーカー遺伝子の例としては（即ち、使用される好適な宿主株に欠損しているマーカー遺伝子）ヒスチジノール デヒドロゲナーゼ遺伝子、アルギニノスクシネット リアーゼ遺伝子、またはオロチシン-5' - リン酸カルボキシラーゼ遺伝子などが挙げられる。そのような宿主株が**ビキア (Pichia)** の形質転換に用いられた場合、上記の修飾遺伝子（直鎖状DNA断片に含まれている）は、好適には宿主株が欠失している独立栄養性マーカー遺伝子の無効の形と会合する（例えば独立栄養性マーカー遺伝子の各々は修飾遺伝子内に含まれているかまたは形質転換用直鎖状DNA断片上の修飾遺伝子の5' または3' に位置している）。本発明の実施での使用が企図されている宿主株の例としては、HIS-4欠失ビキア (Pichia) 株、GS115 (ATCC 20884)、ARG-4欠失ビキア (Pichia) 株、GS1 90、HIS-4/URA3欠失ビキア (Pichia) 株、GS4-2、HIS4/ARG4欠失ビキア (Pichia) 株PPF1 (NRRL Y-180 17；米国特許第4,812,405号参照) などが挙げられる。ヒスチジノール デヒドロゲナーゼをコードしている機能性遺伝子が挿入されている上記修飾遺伝子を含むDNA断片は、例えば、プラスミドpDR401の約5.3 Kbp SacI-EcoRI断片から得ることができる。上記遺伝子の修飾形を含むDNA断片（オロチシン-5' - リン酸カルボキシラーゼをコードしている機能性遺伝子の5' に位置している）の別の断片は、例えば、プラスミドpDR421の約5.0 Kbp BglII断片から得ることができる。

蛋白質分解活性を欠く**ビキア (Pichia)** 株の特に都合のよい応用例は、例えば表面増殖因子 (EGF)、成長ホルモン放出因子 (GIF)、インシュリン様増殖因子-1 (IGF-1) などのような蛋白質分解感受性組換え生成物の発現である。蛋白質分解活性を欠く組換え**ビキア (Pichia)** 株で発現された場合、宿主生物の蛋白質分解装置が修飾されているため、生じる組換え生成物のうける蛋白質分解活性のレベルは低い。

蛋白質分解感受性生成物発生のための蛋白質分解欠失**ビキア (Pichia)** 発現系は種々の方法により作ることができる。例えば**ビキア (Pichia)** 宿

主株は上記のごとく蛋白質分解欠損にでき、次にさらに問題とする異種蛋白質（特に蛋白質分解感受性蛋白質）をコードしているDNAで形質転換される。もししくは、問題とする異種蛋白質をコードしているDNAをすでに有する（bearing）組み換え**ビキア (Pichia)** 株を後から例えば上記のように蛋白質分解を欠失させるようにできる。さらに別の例では、**ビキア (Pichia)** 株は上記の修飾遺伝子および問題とする異種の蛋白質分解感受性蛋白質をコードしているDNAで同時形質転換した。

ペプチド生成物の組換え発現においての宿主株としての**ビキア (Pichia)** 属の株の使用は以前に非常に詳細に記述されている。本発明の実施における使用のために現在のところ好適な酵母種は、唯一の炭素源およびエネルギー源としてメタノールを効率よく利用できる既知の工業的酵母種の**ビキア パストリス (Pichia pastoris)** である。

メチロトローフ酵母には多数のメタノール応答性遺伝子があり、各々の発現はメタノール応答性制御領域（プロモーターとも称される）により制御されている。そのようなメタノール応答性プロモーターは本発明の実施においての使用にも適している。特別の制御領域の例としては、**ビキア パストリス (Pichia pastoris)** AOX1からのプライマリー アルコールオキシダーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. pastoris (pastoris) AOX2 [P. pastoris (pastoris)] は二つの機能的なアルコールオキシダーゼ遺伝子を含んでいることが知られている：アルコール オキシダーゼI (AOX1) およびアルコール オキシダーゼII (AOX2)；二つのAOX遺伝子のコード部分はDNAおよび予測されるアミノ酸配列の両方のレベルで非常に相同的であり、共通の制限部位を共有している：二つの遺伝子から発現される蛋白質は類似の酵素性質を持っているがAOX1のプロモーターはより効率的であり、その遺伝子産物はしばしばより多く発現される] からのセカンダリー アルコール オキシダーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. pastoris (pastoris) からのジヒドロキサンアセトン シンターゼ遺伝子 (DAS) のためのプロモーター、P. pastoris (pastoris) からのP40遺伝子のためのプロモーター、P. pastoris (pastoris) からのカタラーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. pastoris (pastoris) からのカタラーゼ遺伝子のためのプロモーター。

ロモーター、P. pastoris (pastoris) からのアルデヒド デヒドロゲナーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. pastoris (pastoris) からの藻酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のためのプロモーターなどが挙げられる。

現在のところ、P. pastoris (pastoris) 宿主において、蛋白質分解感受性生成物をコードする遺伝子の発現の制御のための好適なプロモーター領域はP. pastoris (pastoris) のメタノール制御プライマー アルコール オキシダーゼ遺伝子のプロモーターである。プロモーターを含むAOX1 遺伝子は単離され、十分に特徴付けられている：Elliott et al., M oI. Cell. Biol. 5: 1111 (1985) および米国特許第4,855,231号参照。

組換え蛋白質発現株の発生のために**ビキア (Pichia)** 細胞の形質転換に使用される現在好適な発現カセットは、転写の読み枠の方向に、以下のDNA配列を含んでいる：

- (i) メチロトローフ酵母のメタノール応答性遺伝子のプロモーター領域；
- (ii) (a) 隨意の分泌シグナル配列、および
- (b) 問題とする異種蛋白質

から本質的になるポリペプチドをコードしているDNA配列；および

- (iii) メチロトローフ酵母中の機能的な転写ターミネーター；

ここで前記DNA配列は、前記ポリペプチドをコードしている配列の転写のため機能的に作用するようお互いに隣接している。本発明の実施に使用される発現ベクターに隨意に含まれている分泌シグナル配列をコードしているDNA配列には、蛋白質分解感受性生成物に開拓した天然の分泌シグナル配列をコードしているDNA、S. cerevisiae (cerevisiae) α-摺合因子 (αMF) リガーゼ配列をコードしているDNA（プロセシング部位をコードしているDNA配列を含む、lysarg）、およびウシ リゾチームC シグナル配列のようなメチロトローフ酵母細胞で機能するシグナル配列を含んでいる。

本発明に従って使用されるメチロトローフ酵母で機能する転写ターミネーターは(a) 転写体内でポリアデニル化信号およびポリアデニル化部位を提供するサブセグメントおよび/または(b) 発現カセットで使用されるプロモーターから

の転写の転写終結信号を提供するサブセグメントを持っている。ここで使用される術語“発現カセット”とは本明細書および請求の範囲を通して、発現過程に機能的に作用する配列を含むDNA配列を意味している。全転写ターミネーターは蛋白コード化遺伝子からとられ、それはプロモーター原の遺伝子と同じでも異なっていてもよい。

蛋白質分解感受性生成物の組換え発現のための宿主の形質転換に使用される本発明のDNA構成物中、発現カセットのセグメントはお互いに“機能するように開拓して”いるであろう。蛋白質分解感受性生成物をコードしているDNA配列はプロモーター、分泌シグナル配列（もし用いられるなら）および転写ターミネーターに関して機能的に作動するように位置し配向されている。従って、プロモーター領域の制御下、ポリペプチドをコードするセグメントは、翻訳により所望のポリペプチドを提供できる転写体内へ転写される。適切な読み枠の位置決定および発現カセットの種々のセグメントの配向は当筆者には周知のことである：より詳細には説明は実施例に与えてある。

本発明の実施には、蛋白質分解感受性生成物の組換え発現のための宿主は、一つのDNA断片に含まれている上記発現カセットの多数のコピーで（好適には先端一端部で配向している）形質転換されるのが好適である。

さらに、本発明に従ったDNA構成物が感度特異的組込みによる蛋白質分解感受性生成物の組換え発現の宿主の形質転換に使用された場合、構成物を含む発現カセットは直鎖状DNA断片（その中のDNA断片の組込みに有効なように宿主の所望の座位へ配向する）である。もし、導入されるべきDNAが標的遺伝子の断片座位と0.2 kbほどの相容性しか持っていないなら、一工程遺伝子組込みが通常有用である：しかしながら、効率を上げるには相容性の程度を最大にするのが好適である。

蛋白質分解感受性生成物の組換え発現の宿主の形質転換に本発明に従って使用されるDNA構成物は随意に一つまたはそれ以上の発現カセットに加えて選択可能なマーカー遺伝子をさらに含んでいる。この目的には、メチロトローフ酵母中で機能的に作動する任意の選択可能マーカー遺伝子が用いられる、即ち、メチロトローフ酵母細胞に表現型を与える、それにより大多数の非形質転換細胞の中でも同

## 特表平6-506117 (30)

走が可能になり、および選択的に増殖する。選した選択可能マークー遺伝子には、例えば、独立栄養性突然変異体 P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) 宿主株および宿主欠陥を補足する野生型生合或遺伝子から組立てられた選択可能マークー系が挙げられる。例えば、HIS4-P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) 株の形質転換にはS<sub>1</sub>、セレビジエ (cerevisiae) または P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) HIS4 遺伝子が用いられるであろうし、ARG4-突然変異体 P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) 株の形質転換には S<sub>1</sub>、セレビジエ (cerevisiae) ARG4 遺伝子または P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) ARG4 遺伝子が用いられるであろうし、URA3-突然変異体 P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) 株の形質転換には、S<sub>1</sub>、セレビジエ (cerevisiae) URA3 遺伝子または P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) URA3 遺伝子が用いられるであろう。

さらに、本発明のこの態様に従った蛋白質分解感受性生成物の組換え表現の宿主の形質転換に使用されるDNA構成物は、随意に細胞内で機能的に作用する選択可能マークー遺伝子をさらに含んでいる。従って、大多数の形質転換細胞の中から同定されおよび選択的に増殖するように細胞細胞を形質転換することを可能にする細胞表現型を与える任意の遺伝子が使用できる。この追加の選択可能マークーは本発明のDNAの増幅のため大腸菌のような細胞内への形質転換を可能にする。選した選択可能マークーにはアンピシリン耐性遺伝子 (Amp<sup>r</sup>)、テトラサイクリン耐性遺伝子 (Tc<sup>r</sup>) などが含まれる。

本発明のDNAが細胞細胞でも適用するように意図された場合、細胞の世代から世代へ本発明のDNAが維持されるのを確実にするため、DNA構成物中に細胞の複製起点を包含させる事が望ましい。細胞の複製起点の例としては U-O<sub>ri</sub>、コリシン、C<sub>o</sub>I、E などが含まれる。

ここで使用される術語“表現ベクター”には、その中に含まれているDNA配列を発現できるベクターを含んでいるつもりであり、そのような配列はその発現が有効なように他の配列と（即ち、プロモーター配列）機能的に作用するような関係にある。一般には、組換えDNA技術で通常使用される表現ベクターはしばしば“プラスミド”的である（即ち、環状、二本鎖DNAループ、そのベクタ

ー形では染色体に結合しない）。本明細書においては術語“ベクター”および“プラスミド”は互換的に使用されている。しかしながら、本発明には機能的に均等な他の形の表現ベクターも同様に含まれるつもりである。

ピキア (Pichia) 属の酵母を形質転換する方法、ならびに、そのような酵母細胞の培養に応用できる方法は一般的には本分野では既知である。

本発明に従うと、上記の技術遺伝子および/または異種の蛋白質分解感受性生成物をコードしている表現カセットを含む構成物は上記のように、フェロプロラスト技術または全細胞培養リチウム酵母形質転換系によりピキア (Pichia)細胞内へ移される。

所望の表現型および遺伝子型である形質転換された株はバッチまたは連続モードで発酵槽中で増殖される。メチロトローフ酵母中の組換えDNAに基づく生成物の大規模生産には、三段階、高細胞密度発酵系が現在好適な発酵プロトコールとして用いられている。最初の段階（または増殖段階）では、発酵宿主は非誘導炭素源（例えばグリセロール）を過剰に含む限定最小培地で培養される。そのような炭素源での増殖では異種遺伝子発現は完全に抑制され、異種蛋白質を発現しない細胞塊の発生が可能である。この増殖段階の間、P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) 細胞は一般にその最適な増殖に約5のpHを評んでおり、培地のpHを約5に維持することが現在のところ好適である。次に、さらに細胞塊を増加させ、メタノール応答性プロモーターを抑制するため、短い期間、非誘導性炭素源制限増殖を行う。この制限増殖期間の培地のpHは適切なpH値に維持される（使用される実際のpHは発現に使用された特定の宿主株および発現される生成物に依存する）。

制限条件下での増殖期間に統一して、プロスからの生成物の同時除去による連続式法；またはプロスのメタノール含量が低レベルに維持されるバッチ方法（ここでは“メタノール過剰供給バッチモード”と称される）により発酵槽にメタノールが添加される。メタノールの添加はメタノール応答性プロモーターにより制御されている遺伝子の発現を誘導する。この第3段階は、この段階で大多数の組換え生成物が発現されるので生産段階と称される。生産段階の間の培地のpHは適切なpH値に維持される（用いられる実際のpHは発現に使用される特定の宿

主株および発現される特徴の生成物に依存する）。

術語“培養”とは細胞増殖の助けとなる培地中での細胞の増殖、およびそのすべての継代培養を意味している。術語“継代培養”とは別の培養の増殖細胞（振培養）の細胞培養、または問題とする継代培養および振培養間で実施された継代培養工程の数とは無関係に、振培養の任意の継代培養を意味している。

本発明の好適な実施態様に従うと、蛋白質分解感受性生成物の產生に使用される異種蛋白質発現系は、非常に効率が高く厳密に制御される P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) のメタノール制御 AOX1 遺伝子から誘導されたプロモーターが利用される。この遺伝子は同様に転写ターミネーター領域もありうる。現在好適な発現カセットは、お互いに機能的に作用する P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) AOX1 プロモーター、随意の分泌シグナル配列をコードしているDNA、蛋白質分解感受性生成物（例えば成熟ICF-1、EGF、CRFなど）をコードしているDNA配列、および P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) AOX1 遺伝子から誘導された転写ターミネーターを含んでいる。好適には一つの複数するDNA断片上の複数の発現カセットを得るために、一つのDNA断片上に、先端一末端の配向で二つまたはそれ以上のそのような発現カセットが含まれている。

多発現カセットで形質転換されるべき好適な宿主細胞は現在のところ、形質転換DNA断片上に存在するマークー遺伝子で補足できる少くとも一つの突然変異を持つ P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) 細胞である。好適には HIS4-(GS115) または ARG4-(GS190) 単一独立栄養性突然変異体 P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) 株が用いられるが、HIS4-/URA3-(GS4-2) または HIS4-/ARC4-(PPF1) 二重独立栄養性突然変異体 P<sub>1</sub>、パストリス (pastoris) 株も用いられる。

一つまたはそれ以上の発現カセットを含む断片は宿主の代謝欠陥を補足するマークー遺伝子および隨意に細胞マークー遺伝子、ベクター組込みを方向付ける酵母DNA配列などを含むプラスミド内へ挿入される。

本発明の特徴の実施態様に従うと、オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を含むピキア (Pichia) 属の種から得られる革離DNA断片が提供される。オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子はしばしば U

RA3 と称される。例えばそれは URA3 欠失株の補足に使用できる。ピキア (Pichia) ゲノムの特定の座位置（即ち、URA3 位位置への）DNAの目標とする能力が本新規遺伝子の別の使用法である。もしくはこの新規遺伝子は配列番号4に示したものと同一アミノ酸配列を実質的に持つ蛋白質をコードしていると特許付けてできる。当事者は上記のアミノ酸配列は種々のメクレオチド配列によりコードできることを認識しているであろうが、上記のアミノ酸配列をコードしている好適なメクレオチド配列は配列番号3に示された配列と実質的に同一である。

本発明の別の特徴の実施態様に従うと、組換えDNA物質で形質転換できる宿主として（宿主はオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子欠失している）ピキア (Pichia) 属の酵母細胞が提供される。URA3 が欠失した宿主株は、無傷の形の URA3 遺伝子を含むDNAによる形質転換に使用でき、それにより所望の形質転換が起こったかどうかを容易に決定できる（形質転換が成功した細胞ではウラシル原産性が戻ることにより）。

URA3 ピキア (Pichia) 株とピキア (Pichia) オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼマークー遺伝子の組み合わせは、蛋白質分解活性を欠くピキア (Pichia) の組換え株の產生に使用するため特に有用な選択系を提供する。そのような選択系はここでは“二方向性選択法”と称される。蛋白質分解活性を欠くピキア (Pichia) の発現のためのこの選択系は、欠失遺伝子を含むDNA断片が宿主生物のゲノムへ附加され、統一して内在性的遺伝子配列および組み込まれたベクター配列間に相容的組換えにより宿主からDNA断片の一部および内在性配列を除去する“ポップーイン-ポップーアウト”遺伝子破壊技術を使用する。最初に、形質転換体は URA3 のようなマークー遺伝子を含む破壊ベクターの取り込みにより選択される（即ち、“ポップーイン”工程）。次に、選択された形質転換体は内在性遺伝子配列および組み込まれたベクター配列間に組換えが起こり、それによりマークー遺伝子を含むベクターの一部および宿主の内在性配列が切り出された株を同定するためにスクリーニングされなければならない（即ち、“ポップーアウト”工程）。URA3 遺伝子および URA3 宿主に基づく二重選択系で所望の株の選択性が行われる。

## 特表平6-506117 (31)

この型の遺伝子破壊は典型的には、5-フルオローオロチニ酸 (5-FOA) 耐性により同定できる Ura3 株で実施される。破壊されるべき標的遺伝子の欠失コピーおよび機能的 URA3 遺伝子を破壊ベクターは含んでいる。Ura3 寄主細胞のゲノムへの破壊ベクターの組込みは、一つの機能的標的遺伝子および一つの非機能的（即ち、破壊された）標的遺伝子を含む Ura3 形質転換体を発生させる。Ura3 形質転換体はウラシル非存在下で増殖できるその能力により、容易に同定される。

組換えにより、欠失遺伝子のみを残して機能的標的遺伝子が除去された株を単離するため、組換えに伴う URA3 遺伝子の損失（“ポップーアウト”）により生じた 5-FOA 耐性の復元で Ura3 形質転換体がスクリーンされた。URA3 遺伝子型の再生はゲノム中の他の遺伝子の競争での破壊のための“ポップーアウト”過程の繰り返しを可能にする。蛋白質分解活性を欠く Pichia (Pichia) 株の発生にこの選択系を使用するためには、Pichia (Pichia) 蛋白質分解経路に含まれる蛋白質をコードする遺伝子の修飾形および URA3 遺伝子を含む DNA 構成物で URA3 基因が形質転換される。遺伝子付加による形質転換 DNA の部位特異的組込みにより（即ち、“ポップーアウト”）、蛋白質分解活性に直接または間接的に影響を及ぼす遺伝子の位置に一つの機能的および一つの非機能的な遺伝子ならびに無効の URA3 遺伝子を得る。URA3 遺伝子を取り込んだ株は陽性選択により同定される（当業者にはよく知られている技術を用いて、例えばウラシルを欠く最小培地上で株を増殖させ、そのような培地上で増殖できる株を選択することにより）。蛋白質分解活性に影響する蛋白質をコードしている遺伝子の位置での機能的、非機能的および URA3 遺伝子のコンフィギュレーションにより、機能的および非機能的遺伝子の一つおよび URA3 遺伝子の喪失を生じる機能的および非機能的遺伝子間の組換えが可能になる（即ち“ポップーアウト”）。

その後、細胞をウラシル経路中間体の非毒性類似体である 5-フルオローオロチニ酸 (5-FOA) (URA3 株により代謝された場合、細胞にとって毒性的ある化合物を產生する) を含む培地上に播種することにより、機能的 URA3 遺伝子を欠く株が陽性選択できる。なぜなら URA3 株はウラシル経路の特徴

の点が阻害されているので 5-FOA を代謝せず、その毒性効果を受けない（従って“5-FOA 耐性”と称することができる）。対照的に URA3 株は 5-FOA を代謝して毒性化合物を產生し、それが URA3 細胞の増殖を妨げる。得られる URA3 細胞は機能的標的遺伝子も欠いており、蛋白質分解活性が欠失されている。URA3 表現型は復元されるので、得られる細胞は選択可能マークとして URA3 を再び用いて形質転換できる。

ウラシル経路中間体の毒性類似物を用いて、機能的 URA3 遺伝子を欠く株を陽性選択できるため、これを Pichia (Pichia) 寄主に複数の表現型変化を与える非常に都合の良い“ポップーアウト”法として使用できる。

同じ種の野生型株中に存在する蛋白質分解活性と比較して蛋白質分解活性が欠失されている URA3 Pichia (Pichia) 株は天然形の URA3 遺伝子および蛋白質分解感受性生成物を含む表現ベクター（両方とも同一のベクターの一部として、または寄主内へ形質転換される第二のベクターとして）での形質転換に特に有用である。ウラシル原葉酸性が復元されたこれらの形質転換体は（簡単なスクリーニング法により容易に決定できる）、それらの中に蛋白質分解感受性生成物をコードしている遺伝子を取り込んでいるはずであり、從って生成物発現に直接利用できるであろう。

本発明はここで以下の実施例を参照しながらより詳細に説明されるが、以下の実施例に制限されるわけではない。

### 実施例

#### 実施例 I : P. pastoris PEP4 遺伝子の単離

P. pastoris PEP4 遺伝子は、相同的な Saccharomyces cerevisiae PEP4 遺伝子の放射性標識断片とハイブリダイズするその能力を利用してバクテリオファージ ラムダからの EMBL3 P. pastoris ゲノム DNA ライブライナーから同定された。ハイブリダイズした組換えファージ DNA を含む陽性ブラークを単離することにより P. pastoris PEP4 遺伝子がクローニングされた。

#### A. P. pastoris (pastoris) EMBL3 ゲノム DNA ライブライ

C. 2 日間のインキュベーションにより達成された。

P. pastoris (pastoris) ゲノム DNA 断片および EMBL3 ベクター アームの結合により調製された組換えバクテリオファージ DNA はインビトロで市販のパッケージング抽出物 (Stratagene EMBL3 クローニングキット) を用いてパッケージングされた。EMBL3 に基づく P. pastoris (pastoris) ゲノムライブライナーは組換えファージをプロフェージ P2 を含む大腸菌宿主株 P2-392 (Stratagene EMBL3 クローニングキットで提供されている) とともに播種することにより増殖された。野生型バクテリオファージは大腸菌株 P2-392 中では増殖しない。P2 感受性を与える野生型遺伝子の二つを欠く組換え EMBL-3 によるバクテリオファージはこの P2 含有大腸菌株中でよく増殖できる。増殖において、宿主株として大腸菌 P2-392 を使用すれば、細胞宿主中組換えファージのみが増殖することが保証される。

EMBL3 に基づく P. pastoris (pastoris) ゲノム DNA のすべてのプレートに SM 噴霧液 (5.8 g NaCl, 2 g MgSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 50 ml 1M トリス-HCl, pH 7.5, および 5 ml 2% ゼラチンを 1 リットルに含む) を喷霧した。5 時間後、上液を吸い取ってブールし、説明書に従って力値およびゲノム当量を計算した。このライブライナーは約 10 ゲノム当量を含んでおり、その力値は  $6 \times 10^{11}$  ブラーク形成単位/ml (pfu/ml) であった。

#### B. プローブとして S. cerevisiae (cerevisiae) PEP4 遺伝子を用いる EMBL3 P. pastoris (pastoris) ゲノム DNA のスクリーニング

PEP4 遺伝子に対する Pichia (Pichia) ゲノムを充分にスクリーンするため、50,000 の組換えファージおよび大腸菌宿主株 E392 (Stratagene EMBL3 クローニングキットで提供される) を 4 つの大きな 150 mm プレートに播種した。6-7 時間増殖させた後、プレートを 4°C に冷やした。各々のプレートをマーカーし、各々のプレートのブラークリフトの複製は各々のプレート上にニトロセルロースを覆すことにより調製した。フィ

### 二の作製

バクテリオファージ 1 が P. pastoris (pastoris) PEP4 遺伝子のクローニングのための運搬体として使用された。P. pastoris (pastoris) ゲノム DNA の Sau3A 部分消化の断片が細胞宿主中の組換え DNA の増殖に必須のバクテリオファージ 1 ゲノムの要素を含んでいるバクテリオファージ 1 ベクター EMBL3 [Frischauf, A. - M. et al. (1983), J. Mol. Biol. 170: 827] 内へ挿入された。P. pastoris (pastoris) DNA 含有 EMBL3 ベクターはインビトロで感染性ビリオンへパッケージされバクテリオファージ 1 P. pastoris (pastoris) ゲノム DNA ライブライナーを得た。ライブライナーの増殖は組換えウイルスで感染させた大腸菌宿主細胞中の組換え DNA の増殖により達成された。ガラス障壁毛細管技術 [Gregg et al., Mol. Cell. Biol. 5: 3376-3385 (1985)] を用いて单離された Pichia Pastoris (Pichia pastoris) ゲノム DNA (NRRL Y-11430 株、Northern Regional Research Center, Peoria, IL) は 0.1 μg/μl の有効濃度で、37°C にて 7, 14, 21 および 28 分のインキュベーションによる Sau3A の消化を実施した。各々のインキュベーション混合物の一部は消化された DNA 断片の大きさを決定するために 1% アガロースゲル上、電気泳動により分離された。7 および 14 分インキュベーションされた消化物は主として 9-23 kb 断片から成っていると思われた。これらの消化物をブールし、下記のように調製された EMBL3 ベクター アームへ連結した。

EMBL3 ベクター アームはベクター (EMBL3 クローニングキット、Stratagene Cloning Systems, San Diego, CA から得られた；カタログ番号 241211) の BamH I および EcoR I による二重消化により調製された。スクジャー断片からアームを分離している小さな BamH I / EcoR I リンカーハエタノールによる選択的沈殿により消化物から除去された。1 μg の EMBL3 前消化アームへの Sau3A 消化 Pichia (Pichia) ゲノム DNA (0.5 μg) の結合は 5 μl の反応混合物の 4

ルターを変性させ、中和し、続いて、S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4 遺伝子 [Thomas Stevens, University of Oregon, Eugene, Oregon の研究室から入手したS. セレビジエ (cerevisiae) PEP4 遺伝子を含む、ゲルで精製されたS. セレビジエ (cerevisiae) DNA の  $^{32}P$  標識 4. 0 kb 断片; Rothman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3248-3252 (1986) 参照] で検査された。ハイブリダイゼーションは 30% ホルムアルデヒド、6×SSC、5×デンハート液、20 mM トリス・HCl・pH 8.0、1 mM EDTA、0.1% SDS および 100 μg/ml 1サケ精子DNA を含む溶液中、37°C で実施された。ハイブリダイゼーション後、2×SSC および 0.1% SDS を用い室温で 3 回フィルターを洗浄した。これらの最初の洗浄に続いて、2×SSC および 0.1% SDS を用いて 55°C にて 2 回洗浄した。

S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4 遺伝子の断片にハイブリダイズする DNA を含む 15 の陽性ブラークがフィルターのオートラジオグラムから二通り (in duplicate) 同定された。15 の陽性ブラークの各々の肩の領域を単離し、SM 級硝酸中に置いた。单離物のうちの 6 つを  $10^{-1}$  および  $10^{-2}$  の希釈で大腸菌株 LE 392 と共に小さな 100 mm ブレートに播種した。第 1 のブラークスクリーニングで使用されたものと同一のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下、各々のプレートのシングル ブラークリフトが S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4 遺伝子断片で検査された。この 2 回目のスクリーニングにおいてオートラジオグラム上 12 の陽性ブラークが検出された。これらのシングルブラークの 9 つが単離され、SM 級硝酸中に置かれた。これらの 9 つのブラークの各々が  $10^{-1}$  および  $10^{-2}$  の希釈で大腸菌株 LE 392 と共に小さな 100 mm ブレートに播種された。再び、最初の 2 回のスクリーニングで使用したものと同一のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下、S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4 遺伝子断片で各々のプレートのシングル ブラークリフトが検査された。各々のプレートはブレートに均等に分布する約 10-20 のブラークを含んでいた。フィルターのオートラジ

オグラムにより各々のプレート上のすべてのブラークが PEP4 プローブにハイブリダイズしたことが明らかにされた。

異なったプレートから 5 つの別々のブラークを単離し、SM 級硝酸中へ置いた。これらの单離物の 3 つ (各々 4721, 5111 および 5131 と称される) の大腸菌培養から DNA が、雄株えファージに含まれている PEP4 遺伝子の同定、特徴付けおよびサブクローニングのためにバクテリオファージ単離の標準法 [Maniatis, T., Fritsch, E. F. および Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA (1982)] を用いて調製された。

C. S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4 遺伝子にハイブリダイズした EMBL3P、バストリス (pastoris) ゲノム DNA ライブラーーの单離物中の特徴づけ

EMBL3P (Pichia) ゲノム DNA ライブラーーからの 3 つの单離物 (4721, 5111 および 5131, 上記参照) から調製された組換えファージ DNA は各々の制限エンドヌクレアーゼで消化され、0.8% アガロースゲル上で分離され、エチジウムプロミド染色により可視化された。さらに、これらの消化物の 1 μl が第 2 のアガロースゲル上で分離され、ニトロセルロース上にプロットされ放射性標識 S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4 遺伝子の断片で検査された。30% ホルムアルデヒド、6×SSC、5×デンハート液、20 mM トリス・HCl・pH 8.0、1 mM EDTA、0.1% SDS および 100 μg/ml 1サケ精子DNA を含む溶液中、37°C でハイブリダイゼーションが実施された。続いてフィルターは 2×SSC および 0.1% SDS を用いて室温で 5 分間 3 回、続いて 2×SSC および 0.1% SDS を用いて 5°C で 5 分間 2 回洗浄した。

2 つのクローン (5111 および 5131) からの DNA の同じ消化物がエチジウムプロミド染色により決定され、同じパターンの制限酵素断片が得られたが、第 3 のクローン (4721) からの DNA の同じ消化物からは異なる断片パターン

が得られた。S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4 遺伝子断片に対するサザンプロットハイブリダイゼーションにより各々のクローンからの DNA の制限酵素断片の分析により、クローンの 2 つの組の両方とも同じ大きさの一連のハイブリダイズする断片を含んでいることが明らかにされクローンの二つの組はプローブハイブリダイズした共通の重なった DNA 配列を持っていることが示された。

#### D. クローン化 P. バストリス (pastoris) PEP4 遺伝子のサブクローニングおよび特徴づけ

プローブとして相同的な S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4 遺伝子を用いる EcoRI 消化 P. バストリス (pastoris) ゲノム DNA のサザンプロットハイブリダイゼーションにより決定されたごとく、P. バストリス (pastoris) PEP4 遺伝子は P. バストリス (pastoris) ゲノムの 10.6 kb EcoRI 断片内に含まれている。実施例 1 C に記載したことなくクローン 4721 の EcoRI 消化 DNA のサザンプロットハイブリダイゼーションは、それが S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4 遺伝子へハイブリダイズした 10.6 kb 断片を含んでいることを明らかにした。クローン化 P. バストリス (pastoris) PEP4 遺伝子の操作を容易にするために、单離 4721 からの DNA の EcoRI 断片上に含まれる P. バストリス (pastoris) ゲノム DNA が pUC19 内へサブクローニング化された。クローン 4721 (25 μg) が 300 μl の純容積中、EcoRI (60 単位) にて消化された。消化 DNA は 0.65% アガロースゲル上で分離され、DE81ペーパーで 10.6 kb EcoRI 断片が単離された。精製断片は 400 μl の 1M NaCl でペーパーから洗い出され、フェノール/クロロホルムで抽出された。DNA は次にエタノールで沈殿され、10 μl の純容積で水に再懸濁された。約 50 ng の 10.6 kb 断片は EcoRI で切断され、脱リン酸化されている等量の pUC19 に連結された。連結混合物は大腸菌株 MC1061 の形質転換に使用された。形質転換体はアンビシリコン耐性で選択され、シングル BamHI 断片の存在をコロニー-DNA の制限酵素消化物の分析でスクリーニングした。この形質転換から生じるシングルコロニーは適切な DNA 構成物を含んでいることが確認され、pEP205 と名付けられた (図 2 参照)。

pEP205 (名付けられた) を含むコロニーから作製された。プラスミド pEP202 は完全 P. バストリス (pastoris) PEP4 遺伝子を含んでいる (図 1 参照)。

クローン化 P. バストリス (pastoris) PEP4 遺伝子の配列分析を容易にするために、P. バストリス (pastoris) PEP4 遺伝子の一部が pUC19 内へサブクローニング化された。プラスミド pEP202 は BamHI および EcoRI で消化された。反応混合物は 0.7% アガロースゲル上で分離され、DNA の 0.45 kb BamHI 断片 (図 1 参照) が DE81 ペーパーを用いて単離された。精製断片は BamHI による消化により直鎖化され、脱リン酸化されている pUC19 (~20 ng) と連結された。連結混合物は大腸菌株 MC1061 の形質転換に使用された。形質転換体はアンビシリコン耐性で選択され、シングル BamHI 断片の存在をコロニー-DNA の制限酵素消化物の分析でスクリーニングした。この形質転換から生じるシングルコロニーは適切な DNA 構成物を含んでいることが確認され、pEP205 と名付けられた (図 2 参照)。

プラスミド pEP202 の配列分析で S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4 遺伝子と ~70% の相同性を持つ DNA 配列と同定された。pEP202 のこの配列によりコードされているアミノ酸配列は S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4 遺伝子によりコードされている配列と 69% 相同的である。

実施例 II : P. バストリス (pastoris) PEP4 遺伝子欠失 (PEP4<sup>-/-</sup>) 株の開発

#### A. P. バストリス (pastoris) PEP4 遺伝子破壊ベクター pDR401 の作製

P. バストリス (pastoris) PEP4 遺伝子欠失 (PEP4<sup>-/-</sup>) 株の開発に使用するためベクター pDR401 が作製された。このベクターは、P. バストリス (pastoris) PEP4 株の形質転換に使用された場合、野生型 PEP4 遺伝子の置換による宿主ゲノム内へ組込まれる、欠陥のある P. バストリス (pastoris) PEP4 遺伝子を含んでいる。

pDR401 は以下のとおり 2 工程法で作製された。第 1 の工程では、pEP

## 特表平6-506117 (33)

202からpDR401作製における基礎ベクター（基礎ベクターpEP301）が作製された。ベクターpEP301はpUC19配列およびpEP202からのクローニングP<sub>E</sub>、バストリス (pastoris) PEP4遺伝子を含んでいる。プラスミドpEP202 (15 μg) はSacIで消化された。5.5 kb SacI断片 (SacIリンクーから時計回りに5時のSacI部位まで広がった断片、およびすべてのpUC19配列およびPEP4遺伝子を含んでいる；図1参照) がDE81ペーパーを用いて0.7%アガロースゲルから単離された。断片は400 μlの1M NaClでペーパーから溶出され、400 μlのフェノール／クロロホルムで抽出され、エタノールで沈殿された。このDNAは1 μlのリガーゼおよび1 μl (~10 ng) のDNAを含む1000 μlの溶液中でそれ自身と連結された。連結混合物は室温で1時間インキュベートされた後、大腸菌MC1061の形質転換後に使用された。アンピシリン耐性コロニーが選択され、シングル5.5 kb BglII断片の存在をコロニー-DNAの制限酵素消化物の分析によりスクリーニングした。プラスミドDNAは正しいプラスミド (pEP301と名付けられた、図3) を含むMC1061の形質転換コロニーから調製された。

pDR401の作製の第2工程においては、P<sub>E</sub>、バストリス (pastoris) HIS4遺伝子がPEP4含有プラスミドpEP301内へ挿入され、最終ベクターが得られる。P<sub>E</sub>、バストリス (pastoris) HIS4遺伝子はpYJ8AC1aから調導される2.6 kb BglII断片 [Cregg, J. et al., Mol. Cell. Biol. 5: 3376-3385 (1985)] から単離された。プラスミドpYJ8AC1a (15 μg) はBglIIで消化され、消化されたDNAは0.7%アガロースゲル上で分離された。2.6 kb断片含有HIS4遺伝子は400 μlの1M NaClで溶出してDE81ペーパーから単離され、400 μlのフェノール／クロロホルムで抽出され、エタノールで沈殿されて10 μlの水に再懸滴された。この2.6 kb BglII断片のpEP301の特異的BglII部位への挿入に先立って、約2.0 μgのpEP301がBglIIで消化され、脱リン酸化されおよびフェノール／クロロホルムで抽出された。次に、約50 ngの2.6 kb HIS4含有断片

ルムアミド(DMF)を含む0.6%アガロースゲルおよび1.2 mg/mlの基質APNE (N-アセチル-DLフェニルアラニンβ-ナフチルエステル)をかぶせた。細胞は透過性を上げるために、細胞の液泡含有物のいくつかは試薬APNEに近づくことができる。アガロースオーバーレイが簡略化後、プレートを5 mg/mlファーストガーネット塩の溶液中に浸漬した。APNEはカルボキシペプチダーゼYのエスチル分解活性により切斷される。この反応の生成物はファーストガーネット塩に結合してコロニー中赤色を発する。カルボキシペプチダーゼY活性を欠くコロニーは塩と結合せず、従ってこの活性を持つコロニーよりもより弱く染色される。PEP4コロニーはガーネット塩に暴露後最初の10~15分の間に赤色／ピンク色中心が現われる。対照的に、PEP4座位が欠失しているコロニーはこの色の発色が遅く、赤色PEP4コロニーに比較してピンク色と区別された。このアッセイの結果に基づいて低いカルボキシペプチダーゼY活性を持つことが明らかにされたコロニー(即ち、PEP4コロニーの指標としての強い赤色を発色しなかったコロニー)が単離され、マスタープレートに移され、対照コロニーとともに熱代培養され、オーバーレイアッセイを用いて再びスクリーニングされた。再び強い赤色を発色しなかった20のコロニーが、ベクターpDR401の断片の組込みによりこれらの形質転換体のPEP4座位が破壊されているかどうかを決定するサザンプロットハイブリダイゼーションによる分析のために選択された。

### 2. サザンプロットハイブリダイゼーション分析

低カルボキシペプチダーゼ活性を示した20の形質転換体株 (p1-p20と称される) からゲノムDNAが抽出され、SacIおよびEcoRIで消化された。この過程はHIS4含有PEP4欠失遺伝子を株の形質転換に使用された5.3 kb EcoRI/SacI断片として遺傳せざるはずである。これらの消化DNAから2つのサザンプロットフィルターが調製された：1つのプロットはクローニングP<sub>E</sub>、バストリス (pastoris) PEP4遺伝子の一部を含むpEP301 (図3参照) からの放射性標識1.4 kb XbaI/EcoRV断片で探査され、他のプロットはHIS4遺伝子を含むpDR401からの放射性標識2.6 kb BglII断片で探査された。比較の目的でSacIおよびEc

を約50 ngのBglII消化pEP301と、1 μlの緩衝液、1 μlのリガーゼおよび水を含む総量で10 μlの溶液中で連絡させることにより2.6 kb HIS4含有断片がpEP301内へ挿入された。結合は室温で3時間実施され、連結混合物はMC1061細胞の形質転換に使用された。アンピシリン耐性コロニーから調製されたプラスミドDNAはBglII, SalI, BglII/SalI, BglII/SalI, Pvul, NcoIおよびKpnIで消化され、pDR401の作製が確認された。制限断片パターンは正しいプラスミドpDR401に期待されるものと一致した (図4参照)。プラスミドpDR401はP<sub>E</sub>、バストリス (pastoris) HIS4遺伝子が挿入されたpUC19であり、したがってPEP4構造遺伝子を破壊している。

### B. pDR401の断片によるHIS4P、バストリス (pastoris) 株のGS115の形質転換

P<sub>E</sub>、バストリス (pastoris) PEP4株を作り出すため、HIS4 PEP4 P<sub>E</sub>、バストリス (pastoris) 株GS115 (ATCC 20864) がスフェロプラスト法 (米国特許第4,879,231号参照) に従ってpDR401の5.3 kb EcoRI/SacI断片20 μgで形質転換された。pDR401のこの断片はHIS4遺伝子含有PEP4欠失遺伝子と一致している。この型の組込みにより生じる形質転換株は原発性であり、それに基づいて非形質転換細胞から区別できる。形質転換の頻度は約10<sup>3</sup> μg<sup>-1</sup>DNAであった。

### C. 形質転換体の特徴付け

#### 1. 形質転換体カルボキシペプチダーゼY活性の分析

HIS4形質転換体は次にコロニー-オーバーレイ比色スクリーニング法 [Jones, E. Genetics 85: 23-33 (1977) 参照] を用いてカルボキシペプチダーゼY活性が分析された。このアッセイでは、HIS4形質転換体細胞は寒天プレートから離されプレート当たり~300コロニーの密度でYPD (酵母抽出物、1%ペプトン、2%デキストロースおよび2%寒天) プレート上で増殖された。細胞の透過性を上げるために、プレートに40%ジメチルホ

ルミンで消化されている形質転換宿主株GS115からの対照DNAも分析された。

SacIおよびEcoRIによるGS115からのゲノムDNAの消化によりpEP301の放射性標識XbaI/EcoRV断片中に含まれているPEP4遺伝子の一部にハイブリダイズする2.9 kb断片が得られた。対照的にこのプローブは分析された20の形質転換体のうちの19からのSacI/EcoRI消化DNA中の真になった大きさの断片にハイブリダイズした。株p17からのDNAのみが標識からのDNAハイブリダイゼーションパターンと同一のパターンを与えた。残りの19株は非標識PEP4座位に特徴的な2.9 kbハイブリダイズ断片を欠き、PEP4遺伝子プローブへハイブリダイズする約5.3 kb断片および/またはより大きな断片を含んでいた。5.3 kb断片はSacI/EcoRIによる消化によりベクターpDR401から放出される形質転換DNAと同じ大きさであった。

株p1-p16およびp18-p20からのDNAのサザンプロットハイブリダイゼーションの結果は、これらの株は無傷のHIS4遺伝子とともに欠損PEP4遺伝子を含んでおり株のPEP4座位は破壊されていることを示している。P<sub>E</sub>、バストリス (pastoris) PEP4株のより大規模な培養物のプロセスの蛋白質分解活性を分析するため、実験例IIIに記載されているように株p13が1リットル発酵で増殖された。

#### 3. 形質転換体プロテイナーゼA活性の分析

##### a. プロトコール

8つの形質転換体のプロテイナーゼA活性がJones et al. の方法 [Genetics 102: 655 (1982)] に基づく酵素アッセイを用いて評価された。いくつかの対照株もまたこのアッセイで評価された：PEP4およびS. cerevisiae (cerevisiae) のPEP4株 (株DBY747および20B12、各々Yeast Genetic Stock Center, University of California, Berkeley, CAから) およびP<sub>E</sub>、バストリス (pastoris) PEP4野生型株 (株NRRL Y-11430, Northern Regional Rease

arch Center, Peoria, IL)。

プロテイナーゼAはアスパルチル プロテアーゼ活性に関与する液性酵素であり、S. cerevisiae (*cerevisiae*) のPEP4遺伝子によりコードされている。形質転換体細胞抽出物のプロテイナーゼ活性の評価に使用される方法は酸変性ヘモグロビンからのプロテイナーゼ活性アミノ酸放出の測定に基づいている。形質転換体細胞抽出物は酸変性ヘモグロビンとインキュベートされ、抽出物中に存在するプロテイナーゼA活性はゼロ時間と90分のインキュベーション後に放出されるアミノ酸の量の相違を算定することにより決定された。

S. cerevisiae (*cerevisiae*) 対照株DBY747 (PEP4) および20B12 (PEP4<sup>-</sup>)、PEP4<sup>-</sup> P. pastoris (*pastoris*) 株NRRL Y-11430およびP. pastoris (*pastoris*) の実験PEP4株の培養物をYEPD培地で定常期まで増殖させた。培養細胞 (20 OD<sub>600</sub>単位) を10 mMアジナトナリウムで洗い、次に400 μlの100 mMトリス、pH 7.5中細胞と離してガラススピーズを1分間ボルテックスすることにより溶離させた。溶離細胞はエーベンドルフチューブ中で10分間遠心分離して細胞破片を除去した。遠心後に得られた上澄液 (粗抽出物) は以下のごとくプロテイナーゼA活性が試験された。酸変性ヘモグロビン (400 μl) を50 μlの粗抽出物に加え、37°Cで90分間インキュベートした。0.2 mlの1N過塩素酸の添加により反応を停止させた。遠心分離により不溶性物質を除去し、200 μlの0.31M NaClを200 μlの上澄液に加えた。この溶液の40 μlに対し、逆離アミノ酸のための Pierce BCA蛋白質アッセイキット (例えば米国特許第4,839,295号参照) を用いてアッセイを行った。90分間インキュベーションを行った試料中に存在する逆離アミノ酸の量がランク (ゼロ時間で停止された反応混合物の試料から成る) 中に存在する量と比較された。これら2つの試料間の逆離アミノ酸の相対的相違がプロテイナーゼA活性の尺度である。

#### b. 結果

対照および形質転換株のプロテイナーゼAアッセイの結果 (表1参照; ΔODが試料中の逆離アミノ酸の濃度の尺度である) はS. cerevisiae (*cerevisiae*) のPEP4株のプロテイナーゼA活性はS. cerevisiae (*cerevisiae*) のPEP4<sup>-</sup>株のそれたった10%であることを示している。

表1  
プロテイナーゼAアッセイ結果

株	表現型	ΔOD/ $\mu$ g蛋白質
DBY747(S. cerevisiae)	PEP4 <sup>+</sup>	28.1
20B12(S. cerevisiae)	PEP4 <sup>-</sup>	2.7
P. pastoris (NRRL Y-11430) 対照	PEP4 <sup>+</sup>	13.1
p13	PEP4 <sup>-</sup>	3.3
p20	PEP4 <sup>-</sup>	4.2
p17	PEP4 <sup>+</sup> (?)	7.5
p16	PEP4 <sup>-</sup>	0
p15	PEP4 <sup>-</sup>	0
p13	PEP4 <sup>-</sup>	3.3
p8	PEP4 <sup>-</sup>	3.3
p5	PEP4 <sup>-</sup>	5.0
p2	PEP4 <sup>-</sup>	6.8
p1	PEP4 <sup>-</sup>	6.0

欠失PEP4遺伝子によるPEP4株の形質転換により発生されたPEP4<sup>-</sup> P. pastoris (*pastoris*) 株のプロテイナーゼAアッセイで得られたデータは、形質転換により破壊された形質転換体のPEP4座位を示したこれらの形質転換体からのDNAのサンプル分析の結果と一致した。

#### 実施例III: P. pastoris (*pastoris*) のPEP4株の発酵

##### A. 方法

ベクター-pDR401のPEP4遺伝子含有SacI/EcoRI断片で株GS115を形質転換することにより発生させたP. pastoris (*pastoris*) のPEP4株、p13はグリセロールバッチ増殖、制限グリセロール供給バッチ相およびメタノール供給バッチ相からなる培養プロトコールに従って以下のごとく1リットル発酵により増殖された。

1000 mlの最小培地 (21 ml 8.5%リン酸、0.9 g硫酸カルシウム・2 H<sub>2</sub>O、1.4. 3 g硫酸カリウム、1.1. 7 g硫酸マグネシウムおよび3.2 g水酸化カリウム) より2%グリセロールを含む2リットルの発酵槽をオートクレーブした。殺菌後、4 mlのPTM<sub>1</sub>無氮培液 [6 g/4硫酸銅、5 H<sub>2</sub>O、0.8 g/2タウヒ酸ナトリウム、3 g/2硫酸マンガン・H<sub>2</sub>O、0.2 g/2モリブデン酸ナトリウム、2 H<sub>2</sub>O、0.0.2 g/2ホウ酸、0.5 g/2塩化コバルト、2.0 g/2塩化鉄鉬、6.6 g/2硫酸第一鉄・H<sub>2</sub>O、0.2 g/2ビオチンおよび5 ml硫酸] を発酵槽に添加し、濃NH<sub>4</sub>OHでpHを5に調整した。培地のpHは0.1%ストルクトールJ673泡病剤を含む50%NH<sub>4</sub>OHを添加することにより5に維持された。培養物は緩衝化酵母瓈素塩基 (YNB) グリセロール ブレート (リン酸緩衝液YNB、2%グリセロール、2%寒天) から調製され、2%グリセロールを含むリン酸緩衝液YNB (11.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2.66 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.67%酵母瓈素塩基、pH 5) 中30°Cにて一夜増殖させた。1-8のOD<sub>600</sub>まで増殖されている培養細胞の10-50 mlを発酵槽に接種し、バッチ増殖をグリセロールが枯渋するまで約1日の間続ける。グリセロール枯渋した時点 (培養液の増加により示される)、10 ml/hでのグリセロールの供給 (50%グリセロールに1.2 ml/LのPTM<sub>1</sub>を加えたもの) を開始し、40 mlのグリセロールが添加されるまで続けられた。グリセロール供給の終了後、メタノールの供給 (10.0%メタノールに1.2 ml/LのPTM<sub>1</sub>を加えたもの) を約2 ml/hの初期速度で開始した。3時間後メタノール供給速度を6 ml/hに増加させた。メタノール供給速度は1.2-1.8時間6 ml/hに維持し、次に10 ml/hに増加

し、発酵を持续する間10 ml/hに維持された。400 mlのメタノールが発酵槽に添加された後、容器を取り出した。

##### B. 試料調製

発酵培養の試料 (15 mlづつ) は発酵工程を通して日々の時間間隔で発酵槽から取り出した。各々の試料は6500×gで5分間遠心分離してプロスおよび細胞を分離した。これらの時点でのNH<sub>4</sub>OH、泡病剤・グリセロールおよびメタノール含量のレベルが記録された。上澄中のメタノールおよびエタノール濃度はPorapak Qカラム (Alltech) を用いるガスクロマトグラフィーにより決定された。

さらに、培養物の細胞重量が発酵槽中の細胞増殖の指標として決定された。この目的のためには、発酵培養物の1 mlをマイクロフュージ中4分間遠心分離し、上澄液を濾絞させて捨て、湿潤ベレットを秤量した。

##### C. 結果

1リットル発酵中のP. pastoris (*pastoris*) p13のPEP4株の増殖は発酵の間隔々の時間で発酵培養物の湿潤細胞重量 (g/m) を決定することによりモニターされた。発酵のメタノール供給バッチ相の間のp13株の増殖の時間変化は、類似の1リットル発酵の間のHIS4 PEP4株G+PA0804H2 (野生型HIS4遺伝子を含む発現ベクターでHIS4 PEP4 P. pastoris (*pastoris*) 株GS115を形質転換することにより発生する) の増殖の時間変化と比較した場合、P. pastoris (*pastoris*) のPEP4株の増殖能力はPEP4株のそれと匹敵することが示された。

#### 実施例IV: 1リットル発酵で増殖されたP. pastoris (*pastoris*) のPEP4株のプロスの蛋白質分解活性の分析

P. pastoris (*pastoris*) PEP4遺伝子の破壊がP. pastoris (*pastoris*) のプロス蛋白質分解活性の変化を伴ったかどうかを決定するため、PEP4株、株p13、およびPEP4株の1リットル発酵からのプロスの蛋白質分解活性が比較された。この研究においては、2つの異なるペプチド、表皮増殖因子 (EGF: 米国特許出願番号323,964号に記載されているごとく、標品53アミノ酸EGF分子の最初の52アミノ酸から成る組換えで

## 特表平6-506117 (35)

合成された分子) および成長ホルモン放出因子 (GRF : EP 205783 に記載されているごとく組換えで合成された) が別々に PEP4 P. pastoris (pastoris) 株 p13 の 1 リットル発酵からの細胞を含まないプロス中で、および HIS4 PEP4 P. pastoris (pastoris) 株 G+P AO804H2 の同様な 1 リットル発酵からの細胞を含まないプロス中で室温にてインキュベートされた。特定の期間のインキュベーションの後、各々のインキュベーション混合物の一部が逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により試験されて (下に記載) 各々の試料中に残存する無傷のペプチドの量が決定され、それによりペプチドの蛋白質分解の程度が決定された。

### A. 逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

緩衝液および P. pastoris (pastoris) 株の発酵からのプロス中の EGF および GRF ペプチドの分析に使用された逆相 HPLC 系は、Waters 600 (Bedford, MA) 滤過送液システム、Waters モデル 481 Lambda Max 可変波長検出器、Wisp 710 B オートインジェクターおよび Shimadzu Chrom-Pac 分析器 (Cole Scientific, Morepark, CA) である。PEP4 P. pastoris (pastoris) 株 p13 および HIS4 PEP4 P. pastoris (pastoris) 株 G+PAO804H2 の発酵によるプロス試料は 0.1M リン酸ナトリウム、pH 5.0 で 1:10 に希釈した。1.5 マイクロリットルの濃縮 GRF 脍液が 285 μl の希釈プロスに添加され 4 時間インキュベートされた。リン酸緩衝液で同様に希釈した GRF 脍液もまた対照として 4 時間インキュベートされた。6.0 マイクロリットルの EGF 脍液が 240 μl の希釈プロスまたは緩衝液に添加され、8 時間インキュベートされた。各々のインキュベーション混合物試料は別々に、Waters μBondapak C18 逆相カラムにインジェクトされた。20–60% 移動相 B (95% アセトニトリル、5% 水、0.1% トリフルオロ酢酸) の 20 分での直線濃度勾配によりペプチドがカラムから溶出された。移動相 A (0.1% トリフルオロ酢酸) は溶出濃度勾配を作成する移動相 B の希釈に使用された。

### B. 結果

Ichiba ゲノム ライブライ中で同定される。P. pastoris (pastoris) URA3 遺伝子はライブライ-DNA で形質転換され、ウラシルを欠く培地上で増殖できる大腸菌株 CSH-28 のコロニーを単離することによりクローニングされた。

### A. P. pastoris (P. pastoris) YE p13 ゲノム DNA ライブライ

プラスミド YEp13 [Broach 等, Gene 8: 121–133 (1979)] は、S. cerevisiae (S. セレビジエ) (2μレブリコン) と E. coli (大腸菌) (pBRori) の両方の複製の起源を含む便利なシャトルベクターである。さらに、YE p13 は大腸菌の形質転換の選択的マークとして用いるための Amp<sup>R</sup> (アンピシリン耐性) 遺伝子と、S. cerevisiae における選択的マークとして用いるための LEU 遺伝子 (リオシン生合成路遺伝子) を含む。P. pastoris (宿株 NRRL Y-11430) ゲノム DNA ライブライは、Cregg 等が述べているように [Mol. Cell. Biol. 5: 3376–3385 (1985)]、プラスミド YEp13 を用いて作製されている。

### B. URA3 遺伝子に関する P. pastoris YEp13 ゲノム DNA ライブライのスクリーニング

pyrF 大腸菌株 CSH-28 [Miller, J. H., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州, コーラルドスプリングスバー (1972) を参照のこと] はオロチジン-5'-ホスフェート デカルボキシラーゼ活性を有さず、合成培地上で増殖する場合にウラシルを必要とする。S. cerevisiae URA3 遺伝子が大腸菌における pyrF 突然変異を相補できることは実証されている [Rose, M., Grisafi, P. 及び Botstein, D., Gene 29: 113–124 (1984)]。それ故、大腸菌株 CSH-28 の pyrF 突然変異を相補できる P. pastoris URA3 遺伝子に関して P. pastoris YEp13 ゲノム DNA ライブライをスクリーニングするために、このライブライからの DNA によって、大腸

0.1M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0、中に含まれている無傷の EGF または GRF およびプロス中に含まれている EGF または GRF の HPLC 分析で得られたクロマトグラムを比較することにより無傷のペプチド [PEP4 P. pastoris (pastoris) 株の発酵プロス中および P. pastoris (pastoris) 株 G+PAO804H2 のプロス中でインキュベートされた EGF または GRF 分子] の量が評価された。標準の無傷のペプチドの HP LC 分析によるクロマトグラムは試料中に存在する標準ペプチドの量およびペプチドの特有の保持時間に反映した主ピークから成っている。対照的に両方のペプチドの蛋白質分解断片は無傷のペプチドに関連した保持時間と異なった種々の長さの時間 HPLC カラム上に保持される。従って、両方のペプチド (EGF または GRF) の蛋白質分解断片の HPLC 分析からのクロマトグラムはピークの数および大きさおよび断片化率に付随する保持時間などが無傷のペプチドの HP LC 分析で得られるクロマトグラムと異なっている。これらの相違に基づいて、プロインキュベーション試料中の無傷の EGF または GRF ペプチドの量を算定することが可能であった。

PEP4 P. pastoris (pastoris) 対照プロス中でインキュベートされた GRF および EGF 試料の HPLC 分析に基づくと、PEP4 株 G+P AO804H2 の発酵からのプロス中でインキュベーションした後、10% 未満の各々の 2 つのペプチドが無傷で残っていることが決定された。対照的に、PEP4 P. pastoris (pastoris) 株のプロス中のこれらのペプチドの蛋白質分解のレベルは PEP4 株のプロス中よりも著しく低い (4 時間のインキュベーション後でも > 60% の GRF が無傷で残存; 8 時間のインキュベーション後でも > 90% が無傷で残存)。これらのデータは P. pastoris (pastoris) の PEP4 遺伝子の破壊は株のプロス中の蛋白質分解活性をかなり減少させることを示している。

### 実施例 V: P. pastoris (pastoris) URA3 遺伝子の単離

P. pastoris (pastoris) URA3 遺伝子は、大腸菌株 CSH-28 中の pyrF 突然変異 (オロチジン-5'-ホスフェートカルボキシラーゼ活性の欠失に対応する) を補足するその能力でプラスミド (YEp13) に基づくビキア (P.

菌株 CSH-28 を形質転換した。

形質転換 CSH-28 細胞をウラシルを含まない半合成培地上に置いた。形質転換細胞はこの培地上で増殖しなかった。ウラシルを含まない平板培地 (p1ate) 上で増殖できる CSH-28 形質転換細胞 (P. pastoris ゲノムライブライ-DNA によって形質転換) は 1–10% 形質転換用 DNA μg の範囲で発生した。増殖のためにウラシルを必要としない形質転換細胞 10 個からプラスミド DNA を単離した。これらのプラスミドを大腸菌株 CSH-28 の形質転換に用いた、10 個のプラスミドの中の 10 個がこの菌株のウラシル要求性を高頻度で相補した。P. pastoris YEp13 ゲノムライブライ-DNA による CSH-28 の形質転換によって発生した選択形質転換細胞の一つは 6. 8 kb SphI フラグメントを含む 9. 0 kb インサートを収容する。6. 6 kb SphI フラグメントをさらに分析するために pUC19 の SphI 部位にサブクローニングした。

この形質転換細胞からのプラスミド DNA を SphI によって消化させ、0.6% アガロースゲル上の電気泳動に供した。DE81 ベーパーを用いて 6. 6 kb フラグメントを単離し、このベーパーから 1M NaCl 400 μl によって溶出した。DNA はフェノール/クロロホルム 400 μl によって抽出し、エタノールによって沈殿させた。次に、6. 6 kb フラグメントをアルカリホスファターゼ処理 SphI 消化 pUC19 と結合させた。この結合複合物を用いて大腸菌 MC1061 細胞を形質転換させた。アンピシリン耐性形質転換細胞を制限酵素消化コロニー-DNA の分析によって 6. 6 kb SphI フラグメントの存在に関してスクリーニングした。この正確なプラスミドは pPU201 と名付けた。プラスミド pPU201 を用いて CSH-28 を形質転換させた、このプラスミドはこの菌株のウラシル要求性を相補することができた。

### C. プラスミド pPU201 におけるインサートの特徴化

pPU201 を種々な酵素によって消化させ、生ずるフラグメントを DNA 長さコンピュータプログラム (MapSort; ウィスコンシン大学 Genetics, ウィスコンシン州, マジソン) を用いて分析して、フラグメントの大体のサイズを判定することによって、プラスミド pPU201 中の P. pastoris

## 特表平6-506117 (36)

DNAの6、6 kbインサートの制限酵素認識部位の地図(図5)を作成した。pPU201の6、6 kbインサート中に含まれるURA3遺伝子を正確に捕獲するために、pPU201の各制限酵素消化物の5 ngアリコートを1%アガロースゲル上で電気泳動によって分離させ、ニトロセルロースに移し、C. t<sub>e</sub> opticalis(C.トロピカリス) URA3A遺伝子の放射能標識1.3 kb Bgl IIフラグメントによって調べた(PCT公報第WO90/09449号を参照のこと)。2.5%ホルムアミド、6×SSC、5×Denhardt溶被、20 mM Tris-HCl、pH 8.0、1 mM EDTA、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)及び100 μg/mlサケ精子DNAを含む溶液を用いて、フィルターをこのプローブに27°Cにおいてハイブリッド形成した。ハイブリッド形成後に、フィルターを1×SSCと1%SDSを用いて、室温において、1回洗浄につき5~10分間かけて、3回洗浄し、次に0.5×SSCと0.5%SDSを用いて、45°Cにおいて、1回洗浄につき10分間かけて、2回洗浄した。これらの緩和な条件は互いに異なるURA3遺伝子配列の間のハイブリッド形成を可能にした。pPU201の各消化物の追加のサンプルを同じ1%アガロースゲル上で分離し、ハイブリッド形成フラグメントと非ハイブリッド形成フラグメントとを比較するため真化エチジウムによって染色した。ハイブリッド形成フラグメントとpPU201の制限マップとの比較は、pPU201中のURA3遺伝子を図5に示す約1.3 kb Nco I-Sal I フラグメントに局在化することを可能にした。これを知ることによって、次には、P.バストリスURA3遺伝子の塩基配列を決定し、さらに特徴化するために選択したサクション化を構成することが可能になった。

pPU201をEco RVとPst Iによって消化させ、URA3遺伝子を含む約4.0 kbフラグメントを単離し、これをpUC19中にSma IとPst I部位において結合することによって、プラスミドpPU202(図6)を形成した。pPU202をそれぞれ、Sac I、Kpn I及びEco RIによって消化させ、大量(200 μl)に再結合させることによって、プラスミドpPU203、pPU205及びpPU206(図7~9)を形成した。クローン化P.バストリスゲノムインサートDNAフラグメント中並びにpPU202のpUC

19ポリリンカー中にこれらの酵素の各々の認識部位が存在するので、この方法はpPU202中のこれらの部位の間のDNAの便利な除去を可能にした。生ずるプラスミドを次に用いて、大腸菌CSH-28を形質転換させて、各欠失構造体がpyr F突然変異を相補するか否かを判定した。この結果はpPU203とpPU205がウラシルを含まない合成培地上でpyr F菌株の増殖を可能にする機能URA3遺伝子を含むが、pPU206は含まないことを実証した。これらの研究結果はpPU201におけるP.バストリスURA3遺伝子の地図作成(mapped)位置と一致する。

推定の(*putative*)URA3遺伝子を有するP.バストリスゲノムDNAフラグメントのサブクローニングをSangerジオキシ方法によって塩基配列決定した[Sanger等のProc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467 (1977)を参照のこと]。この構造遺伝子と約100 bpのフランギング配列との塩基配列を両方向において調べて、配列番号3に表す。クローン化P.バストリスURA3遺伝子から演繹されるアミノ酸配列(配列番号4を参照のこと)は、S.セレビジエURA3遺伝子から演繹されるアミノ酸配列との73%相同を有し、C.トロピカリスのURA3AとURA3B遺伝子から演繹されるアミノ酸配列との71%相同を有し、*Klebsiella mycetis lactis*(クロイペロミセスラクチス)URA3遺伝子から演繹されるアミノ酸配列との72%相同を有する。

### 実施例VI: ピキアのIGF-1発現PEP4欠失(PEP4')菌株の発生

#### A. 遺伝子増加によるIGF-1発現PEP4菌株の発生

##### 1. P.バストリスPEP4遺伝子破壊ベクター-pDR421の形成

内因性PEP4座に不完全PEP4遺伝子を加えることによる、宿主PEP4遺伝子の破壊によって、ピキアバストリスのPEP4欠失(PEP4')菌株の発生に用いるためのプラスミドpDR421を形成した。このベクターはPEP4遺伝子の内部部分を含み、この部分はP.バストリスのPEP4菌株の形質転換に用いる場合に、PEP4座において宿主ゲノムに結合して、PEP4遺伝子の不完全な非機能性コピーを発生させる。

破壊ベクターpDR421を発生させるために、ピキアのURA3遺伝子をベ

クターpEP205(pUC19配列と、pEP202から捕獲される-450 bp BamHIフラグメントに含まれるPEP4遺伝子部分とから成る)をクローン化させた。これは、pEP205のXba I-Sph I部位(図2参照)中に2 kb Sph I-Sph I DNAフラグメントとしてpPU205からのURA3遺伝子(図8参照)をサクション化することによって実施した。

プラスミドpPU205をSph IとSph Iによって消化させ、この反応混合物を0.8%アガロースゲル上で分離させた。URA3遺伝子を含む2 kb DNAフラグメントをDE81ペーパーを用いてゲルから単離させ、液離し、精製した。プラスミドpEP205をXba IとSph Iによって消化させた。pPU205から単離させた2 kb URA3遺伝子含有Sph I-Sph IフラグメントをXba I-Sph I消化しP205に結合させ、この混合物を用いて大腸菌MC1061をアンビシリントリニティに形質転換させた。アンビシリントリニティを、Bam HI-Sph I制限酵素消化コロニーDNAの2.7 kb、0.4 kb、1.9 kb診断フラグメントの存在に関する分析によってスクリーニングした。形質転換体はpDR421と名付けられた正確なDNA構造を有するプラスミドを含むことが判明した(図10)。

#### 2. IGF-1発現URA3-P.バストリス菌株(IGF-U)のpDR421による形質転換

P.バストリスのURA3-IGF-1発現菌株、IGF-U、をpDR421によって形質転換させて、P.バストリスのPEP4、IGF-1発現菌株を発生させた。

##### a. IGF-Uの発生

5-フルオロオロチニン酸(5-FOA)はウラシル生合成経路中間体の類似体であり、これはUra<sup>-</sup>菌株によって消化されるときに有害な化合物を生ずる。Ura<sup>-</sup>菌株によるウラシル生合成経路はある一定の段階においてブロックされるので、これらの菌株は5-FOA(細胞にとって有害な化合物を形成する)を代謝せず、そのため5-FOA耐性である。これに反して、Ura<sup>-</sup>菌株は5-FOAを代謝し、5-FOA含有培地上では生き残ることができない。それ故、5-FOA含有培地上での細胞増殖は自然突然変異によってUra<sup>-</sup>菌株を発生

させるための方法として用いることができる[例えば、Boekel等、Mol. Gen. Genet. 197: 345-346 (1984)を参照のこと]。

IGF-1発現菌株G+IMB206S1のURA3誘導体[この菌株の説明に関しては、ここにその全體において参考文献として開示する、1990年9月4日出願の共通に論述された米国特許出願No 7/578,728号を参照のこと]は、ウラシル補充5-FOA含有培地[0.67%酵母膏案葉基、2%寒天、2%グルコース、5-FOA 7.50 mg/lとウラシル4.8 mg/l]中にこの菌株の-5 × 10<sup>3</sup>細胞を直接培養することによって形成された。30°Cにおける1週間の培養後、この平板上で増殖するIGF-Uと名付けられたコロニーを単離した。増殖のためにウラシルを必要とする、このコロニーはピキアバストリスのURA3菌株を相補することができなかった。

##### b. IGF-Uの形質転換

pDR421約20 μgをBgl IIによって消化させ、標準スフェロプラスチ形質転換方法によるIGF-Uの形質転換に用いた。形質転換体を8日間にわたるウラシル不存在下で増殖しうるか否かによって選択した。

##### 3. 形質転換体の特性化

###### a. 形質転換体カルボキシペプチダーゼY活性の分析

Ura<sup>-</sup>形質転換体を、次に実施例Iに述べるようなコロニーオーバーレイ比色検査法によって、カルボキシペプチダーゼY活性に関して分析した。この分析結果に基づいて低カルボキシペプチダーゼY活性を有するように思われるUra<sup>-</sup>形質転換体のコロニー(すなわち、PEP4'コロニーを指示する強い赤色を発色できなかったコロニー)を単離し、マスターブレイス(master plate)に移し、対照コロニーと共に難代培養し、オーバーレイ分析法を用いて再スクリーニングした。再度強い赤色を発色することができなかった1コロニーをM+IMB206S1と名付けた。

###### b. 1リットル発酵と1リットル発酵とで増殖したP.バストリスのIGF-1発現PEP4菌株の完全なIGF-1発現レベルの分析

###### i. P.バストリスのIGF-1発現PEP4菌株の発酵

実施例VI. A. 2. b. に述べたように形成されたP.バストリスのIGF

## 特表平6-506117 (37)

-1 発現 PEP4 菌株, M+IMB206S1 をグリセロールバッテ増殖相、制限グリセロール供給バッテ相及びメタノール供給バッテ相から成る三相プロトコールによる 1 リットル発酵と 10 リットル発酵において増殖させた。P. パストリスの PEP4 IGF-1 発現菌株間の完全 IGF-1 発現レベルを比較するため、IGF-1 遺伝子発現カセットの 4 コピーと 6 コピーをそれぞれ含む、P. パストリスの 2 種 PEP4 菌株, G+IMB204S14 と G+IMB206S1 をも次のように比較可能な発酵において増殖させた。

### 1 リットル発酵プロトコール

2 リットル発酵器 (Biolafitte, ニュージャージー州, ブリンストン) に最少培地 900 ml (8.5% リン酸 2.1 ml, 硫酸カルシウム 2 H<sub>2</sub>O 0.9 g と、硫酸カリウム 14.3 g と、硫酸マグネシウム 1.7 g と、水酸化カリウム 3.2 g) とグリセロール 30 g を加えて、オートクレーブ処理した。滅菌後に、PTM<sub>i</sub> (微量 (trace)) 塩溶液 (硫酸第二錠・5 H<sub>2</sub>O 6 g/1, ヨウ化ナトリウム 0.08 g/1, 硫酸マンガン・H<sub>2</sub>O 3 g/1, モリブデン酸ナトリウム・2 H<sub>2</sub>O 0.2 g/1, ホウ酸 0.02 g/1、塩化コバルト 0.5 g/1、塩化亜鉛 20 g/1、塩化亜鉛 2.0 g/1, 5 ml) 4 ml を発酵器に加え、pH を濃 NH<sub>4</sub>OH によって 5 に調節した。pH は 0.1% Struktol J 673 消泡剤 (起泡を制御するために加える) を含む 5.0% NH<sub>4</sub>OH の添加によって調節した。温度を 30°C に維持し、溶解酸素を攪拌、通気、又は酸素を含む空気供給 (seed) の補充の強化によって飽和の 2.0% 以上に維持した。

2% グリセロールを含む緩衝液 (buffered) YNB 中で 30°C において一晩増殖させた細胞から接種物を形成した。発酵器に OD<sub>600</sub> 2~8 までに増殖させた培養細胞 4.0~7.0 ml を接種し、バッテ増殖法 (growth regimen) をグリセロールが消耗されるまで 1.8~2.4 時間続けた。溶解酸素濃度の増加によって指示されるグリセロール消耗の時点で、グリセロール供給 (5.0% w/v グリセロール プラス 1.2 ml/L PTM<sub>i</sub>) を 10 ml/時で開始した。pH 5.0 発酵では、培養物の pH を発酵を通して 5 に維持した。

(1.00% メタノール プラス 1.2 ml/L PTM<sub>i</sub>) を 20 ml/時の速度で開始した。メタノール供給の開始と共に、pH コントローラーの設定点を 2.8 に調節した。次に pH は細胞代謝の結果として、設定点値まで徐々に低下した。4 時間のメタノール供給後、メタノール供給速度を 6.0 ml/時に高め、この速度に全体で約 7.2 時間維持し、7.2 時間に容器を回収した。

### II. PEP4 IGF-1 発現菌株間の IGF-1 発現レベル

P. パストリスの組換え体 IGF-1 分泌菌株の発酵で產生される数形式の IGF-1 の一つは、ジスルフィド結合によって一緒に維持される 2 個以上の IGF-1 分子フランゲメントから成る、ニックが入った (nicked) 種である。これらのフランゲメントは IGF-1 分子のアミノ酸バックボーンの 1 個以上のペプチド結合のタンパク分解開裂によって形成された。ニックド IGF-1 分子と完全 IGF-1 分子とは見かけの分子量 [非還元性条件下で、SDS-PAGE] によって測定] に基づいては難別不能であるので、これらの種は非還元性条件下での逆相 HPLC によって、また還元性条件下 (すなわち、例えばジチオスレイトールのような還元剤の存在下) での SDS-PAGE によって分離することができる。ニックが入った IGF-1 のフランゲメントを保持するジスルフィド結合の還元は、完全な分子よりも小さい分子量を有する、タンパク分解によって生ずる個々のフランゲメントを避離させる。

### IGF-1 発現レベルの定量

細胞を含まないプロスにおけるニックド IGF-1 と真正の (authentic) (完全な、正確に折り畳まれた、モノマーの) IGF-1 の収量を定量逆相 HPLC によって測定した。用いた HPLC 系は、C 18 カラムの代わりに Vydate C 4 カラム (0.46 × 5 cm) を用いた以外は、実施例 IV で述べた系と同じであった。1% 分勾配の 2.5~4.2% 移動相をカラムに 1 ml/分の流速度で 17 分間通して、このカラムからサンプルを溶出した。検出器を 0.05 吸光度単位フルスケール (AUFS) にセットし、最大感度のために 215 nm の波長を用いた。

P. パストリス プロス中の真正 IGF-1 種とニックが入った IGF-1 種

低 pH 発酵 (すなわち、pH 2.8 又は pH 3.5) では、グリセロール供給の開始後に、pH コントローラーの設定点を所定の pH に調節した。4 時間後に、細胞代謝の結果として培養物の pH はこの設定点値にまで低下した。この低い pH を発酵の残りを通して維持した。次にグリセロール供給を停止し、メタノール供給 (1.00% メタノール プラス PTM<sub>i</sub> 1.2 ml/L) を 2 ml/時の速度で開始した。3 時間のメタノール供給後、供給速度を 6 ml/時に高め、この速度を発酵の残りに対して維持した。メタノール供給の開始から 7.2 時間後に、容器を回収した。

発酵を NH<sub>4</sub>OH、消泡剤、グリセロール、メタノール、エタノール、及び温熱重量レベルに關して実施例 I-I に述べたように監視した。プロス (broth) サンプルと細胞サンプルも実施例 I-I に述べたように発酵を通して回収した。

### 1.0 リットル発酵プロトコール

5.5 リットルの全量で、1.0X 基本塩 (8.5% リン酸 4.2 ml/L, 硫酸カルシウム・2 H<sub>2</sub>O 1.8 g/L, 硫酸カリウム 28.6 g/L, 硫酸マグネシウム 23.4 g/L, 水酸化カリウム 6.5 g/L) 3.5 リットルとグリセロール 22.0 g を含む 1.5 リットル発酵器を滅菌した。発酵器が冷却した後に、PTM<sub>i</sub> (微量塩 2.4 ml) を加え、pH を 2.8% 水酸化アンモニウムの添加によって 5 に調節した。pH は同溶液の添加によって調節した。起泡は Struktol J 673 の 5.0% 液の添加によって制御した。温度は 30°C に維持し、溶解酸素を攪拌、通気、反応器圧の強化によって又は酸素を含む空気供給の補充の強化によって飽和の 2.0% 以上に維持した。2% グリセロールを含む緩衝化酵母培养基 (YNB; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.6, 6 g/L, 酵母蛋白塩基 6.7 g/L, pH 6) 中で一晩増殖させた細胞から接種物を作製した。発酵器に OD<sub>600</sub> 2~8 までに増殖させた培養細胞 5.00~7.00 ml を接種し、バッテ増殖法を 1.8~2.4 時間続けた。溶解酸素濃度の増加によって指示されるグリセロール消耗の時点で、グリセロール供給 (5.0% w/v グリセロール プラス 1.2 ml/L PTM<sub>i</sub>) を 100 ml/時で開始し、4 時間続けた。次にグリセロール供給を停止し、メタノール供給

とを HPLC によって識別するために、プロス サンプルを HPLC カラムに負荷する前にプロスから若干の内因性 P. パストリス汚染物を除去することによって、プロスを洗浄することが必要であった。これは、このプロスを 0.25 ml カラムに含まれるスルホプロピルベースドカチオニ交換樹脂に通すことによって達せられた。この樹脂を最初に 0.2 M 酢酸 2 ml と平衡させた。一定量の細胞を含まない乾燥プロス (1 ml) をカラムに負荷し、このカラムを 0.2 M 酢酸 1 ml によって洗浄した。IGF-1 を 0.02 M 酢酸ナトリウム、pH 5.5, プラス 1 M NaCl の 2 ml によって溶出した。溶出液の最初の 1 ml は全 IGF-1 の 7.5~8.0% を含み、通常は回収された唯一の溶出量であった。カラムを次に 1.00% メタノール 2 ml による洗浄によって再生し、それによって再使用のために利用可能にした。

ピキアーケー生 IGF-1 のレベルの定量のために、既知量の標準 IGF-1 (Amgen, カリフォルニア州、オークス) を HPLC カラムに注入し、クロマトグラムの対応ピーク下の面積を測定した。面積を HPLC カラムに負荷した IGF-1 の μg に対してプロットすることによって、標準曲線を形成した。HPLC クロマトグラム ピーク下の面積を IGF-1 濃度に換算するために用いる相関係数を標準曲線から算出した。検出器を 0.05 AUFS と 215 nm の波長にセットした場合に、相関係数はカラムに注入した IGF-1 について 3.5 0 単位/μg であった。この情報を用いて、洗浄されたプロス サンプル中に存在する正確に折り畳まれた、完全なモノマー IGF-1 の濃度を、サンプルの HPLC 分析からのクロマトグラムの対応ピーク下の面積の測定によって、算出することができる。この相関係数を用いて、ニックが入った IGF-1 種の大体の濃度をも同様に算出した。しかし、ニックが入った種の絶対濃度は完全 IGF-1 とニックが入った IGF-1 の面積相関係数の差に依存して変動する。

### 1 リットル発酵の結果

該 PEP4 IGF-1 発現菌株の 1 リットル低 pH (pH 2.8) 発酵は一貫して、PEP4 IGF-1 発現菌株の 1 リットル低 pH 発酵 (~160~190 mg/L) よりも多量の純モノマー (真正 プラス ニックド) IGF-1

持表平6-506117(38)

(~200-250 mg/ml) を生成した。さらに、該 PEP 4 菌株のプロス中の真正 IGF-1 の割合は PEP 4 菌株のプロスにおける同割合 (6.5%) よりも多少高かった (7.7%)。しかし、該 PEP 4 菌株と PEP 4 菌株とのモノマーア IGF-1 産生レベルの非常に大きい明瞭な差が、これらの菌株の pH 5.0 発酵において検出された。PEP 4 IGF-1 発現菌株、G+IMB204S 14 と G+IMB206S 1 の 1 リットル pH 5.0 発酵においては IGF-1 は本質的に検出されなかった。この結果は、PEP 4 菌株の発酵において産生される真正 IGF-1 が pH 5.0 においては大規模なタンパク分解を受けるが、低い pH ではごく限定されたタンパク分解を受けるに過ぎないことを示す。これに反して、該 PEP 4 IGF-1 発現菌株 M+IMB206S 1 の 1 リットル pH 5.0 発酵は少なくとも 2000 mg のモノマー IGF-1 / l を生じ、その約 80% は真正 IGF-1 であった。従って、該 PEP 4 IGF-1 発現菌株は PEP 4 IGF-1 発現菌株に比べて pH 5.0 における真正 IGF-1 の産生に関して有意に改良され、pH 2.8 における真正 IGF-1 の産生に関して多少改良されたよう見える。

## 10リットル発酵の結果

P. パストリスの該 PEP4 IGF-1 発現菌株の 10 リットル発酵は、PEP4 IGF-1 発現菌株の 10 リットル発酵 ( $\sim 170 \text{ mg/l}$ ) よりも多量の純モノマー IGF-1 ( $\sim 200 \text{ mg/l}$ ) を生成した。

該 PEP 4 菌株と PEP 4 菌株の 10 リットル発酵において産生される総モノマー-IGF-1 の組成も異なった。該 PEP 4 菌株 M+IMB 206S1 の 10 リットル発酵における総モノマー-IGF-1 の 7.5% (1.64 mg/l) 以上が真正 IGF-1 であったが、PEP 4 菌株 G+IMB 204S14 の 10 リットル発酵における総モノマー-IGF-1 の約 50% (8.8 mg/l) のみが真正 IGF-1 であった。

さらに、該 PEP4 菌株の発酵における細胞収率は PEP4 菌株の発酵における細胞収率よりも ~30% 低かったので、真正 IGF-1 の細胞当たりの収率は PEP4 菌株の発酵において非常に強化された。該 PEP4 菌株の発酵における細胞収率が低い結果として、該 PEP4 菌株の発酵から多量の細胞を含まないブ

ロスが回収された (PEP4菌株の発酵から回収される細胞を含まないプロセスの量に比べて)。これは該PEP4菌株の発酵からの分泌IGF-1の高レベルの回収を生ずる (PEP4菌株の発酵から回収される分泌IGF-1量に比べて)。

上記結果は、該 PEP 4 IGF-1 発現菌株が真正 IGF-1 の產生に関して、PEP 4 IGF-1 発現菌株に比べて、大規模に改良されることを実証する。

### B. 遺伝子置換によるIGF-1発現PEP4<sup>-/-</sup>細胞の発生

## 1. P<sub>1</sub> パストリス遺伝子破壊ベクター pDR601 と pDR602 の形成

ベクターpDR601とpDR602を、欠陥PEP4遺伝子による内因性PEP4遺伝子の置換による宿主PEP4遺伝子の破壊によるPEP4欠損(PEP4<sup>-</sup>)菌株の発生に用いた。このベクターは下記のように微工芸で形成した(図11の線図も参照のこと)。

pUC19配列と、pEP202からのクローニングP<sub>c</sub>、バストリスPEP4遺伝子とから成るプラスミドpEP301(図3参照)をNcoIによって開裂し、次にDNAをエタノールによって沈殿させ、回収し、再溶離させ、連結反応混合物中に連結させた。この消化と連結は~0.5 kb NcoIフラグメントに含まれるPEP4遺伝子の内部部分を効果的に除去した。連結後に、DNAをBglIIによって消化させ、残りの裸プラスミドを直鎖状化し、このDNAを用いて、大腸菌株MC1061を形質転換させる。アンピシリン耐性コロニーを選択して、コロニー-DNAの制限酵素消化物の分析によって、0.5 kb NcoIフラグメントの存在に関するスクリーニングした。~0.5 kb NcoIフラグメントを有さない欠陥PEP4遺伝子を含む正確なプラスミドはpDL321と名付けた。第2プラスミド、pUC19XXは、SmaIとHincIIによってpUC19を開裂させ、再連結させ、BamHIとXbaI部位を含むボリリンカー部分を効果的に除去することによって形成した。次に、プラスミドpUC19XXをSacIとEcoRIによって切断し、~10 ngをpDL321のSacI/EcoRI 2.2 kbフラグメントの~50 ngと結合させた。このフラグメントはゲル精製され、DE81ペーパーによって単離されたものである。この結合ミックスを用いて、MC1061細胞を形質転換させ、Bgl

S T E I I / Xba I 消化コロニー-DNAの分析によってアンビシリソ耐性コロニーをスクリーニングした。正確な消化物パターンを示すプラスミドは pDL322と名付けた。

次にpDL322をXbaIによって切断し、1.0ngを配列5'-CTAG CGGCCG-3'のオリゴヌクレオチドリンカー1.0ngと結合させた、このリンカーはXbaI部位に結合されたときにXbaI部位を破壊させ、独特のNotIを形成した。この結合ミックスを用いて、MC1061細胞を形質転換させた。アンミシリン耐性コロニーをNotI消化コロニー-DNAの分析によってスクリーニングした、正規なプラスミドをpDL3.2.3と名付けた。

ベクター pDR601 と pDR602 を形成するために、ピキア URA3 遺伝子を下記のように pDL323 中に挿入した。プラスミド pPU205 (図 8 参照) を Pvu I と Aat I によって消化させ、約 2.5 kb Pvu I フラグメント上の URA3 遺伝子を遮離させた。この消化物を 0.8 アガロースゲル上で分離させた。~2.5 kb フラグメントを DE81 ベーパーを用いてゲルから単離させ、溶出し、精製した。プラスミド pDL323 を Eco RV による切断によって直鎖化した。この直鎖化プラスミド (~1.0 ng) を pDU205 と URA3 遺伝子含有 Pvu I フラグメントと結合させて、挿入される URA3 遺伝子の配向に依存して、pDR601 と pDR602 を形成した (それぞれ、図 12 と 13 を参照のこと)。

## 2. pDR601とpDR602によるJGF-Uの形質転換

URA3-IGF-1発現P. バストリス菌株IGF-U（実施例VI, A, 2. aを参照のこと）をpDR601とpDR602から誘導されたDNAの直鎖状フラグメントによって形質転換させた。この直鎖状フラグメントは各側でPEP4遺伝子の一部をコードするDNAによってフランクされるURA3遺伝子を含有了。このフラグメントの末端とPEP4遺伝子との相容性はこのフラグメントのPEP4座における組込みを刺激し、遺伝子置換イベントを生じた。宿主ゲノム中へのいずれのフラグメントの安定な組込みも、フラグメントに含まれるURA3遺伝子の存在のために原核型形質転換体を生じた。この形質転換は下記のように実施した：

pDR601とpDR602の両方を~~Not~~Iと~~Bst~~E Iによって消化させることによって、各側でPEP4遺伝子の一部をコードするDNAによってフランクされるURA3遺伝子から成る直鎖状DNAフラグメント(～4.0 kb長さ)を得た。消化されたDNA(20μg)を用いて、標準スフェロプラスト方法によって菌株IGF-Uを形質転換させた。再生培地上で増殖し、YPED培地上に離代培養した形質転換体から単離したUra<sup>r</sup>コロニーを実施例Ⅰに述べたオーバーレイ方法によってカルボキシペオブチダーゼZ活性に関してスクリーニングした。対照コロニーに比べて赤色を発色しなかったコロニーをサザンプロットハイブリッド形成による分析のために選択した。

### 3. 形質転換体からのDNAのサンプルトハイブリット形成

選択した形質転換体から Hoffmann and Winston の方法 [Gene, 57: 267-272 (1987) ] を用いて、ゲノムDNAを単離した。各個株からのゲノムDNAを *Bam*H I によって消化させた。この処理は pDR601 又は pDR602 のフラグメントの組み込み領域を含む PEP 脲の一部を遮離させる。それ故、この領域のサイズは IGF-U のゲノム中への形質転換用 DNA の適切な組み込みに特徴的である。消化されたDNAに対して 0.8% アガロースゲル上で電気泳動を実施し、ニトロセルロースフィルターにこのDNAをプロットした。このフィルターを P. pasストリス PEP4 遺伝子の一部を含む pEP301 の放射能標識した 1.4 kb *Xba*I / *Eco*RV フラグメントによって、標準方法を用いて、ハイブリッド形成した (*Maniatis, T., Fritsch, E. F.,及びSambrook, J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 3-88頁, Cold Spring Harbor press, 米国ニューヨーク州, コールドスプリングハーバー (1982) )。ハイブリッド形成は 50% ホルムアミド、6X SSC、5X Denhardt's 液液、20 mM Tris HCl、pH 8.0、1 mM EDTA、0.1% SDS 及び 100 μg/ml サケ精子DNAを含む液体中で 37°C において実施した。次にフィルターを 1×SSC、0.1% SDS 中で 3 回 (1 回の洗浄につき 10 分間)、次に 0.5×SSC、0.1% SDS 中で 65°C において 1 時間洗浄した。比較用对照としては、P. pasストリス

## 特表平6-506117 (39)

菌株GS 115、PEP 4菌株、からのゲノムDNAをこの分析に含めた。

GS 115からのゲノムDNAのBstIによる消化は4. 4 kbフラグメントを生じ、これはプローブ中に含まれるPEP 4遺伝子の一部にハイブリッド化した。これに反して、このプローブは少なくとも二つの形質転換体、IGFU 2601-5とIGFU 2602-5からのDNAの6. 9 kbフラグメントにハイブリッド形成した。対照PEP菌に比べて大きいサイズの形質転換体PEP 4座(6. 9対4. 4 kb)は、その構造領域内にURA3遺伝子を有する非機能性PEP 4遺伝子による宿主PEP 4遺伝子の置換と一致した。

これらの結果から、菌株IGFU 2601-5とIGFU 2602-5が遺伝子置換による宿主菌株IGF-UのPEP 4遺伝子の破壊によって生ずる幾つかのPEP 4菌株の例であると結論された。

### 実施例VII : "POPOUT"ベクターを用いるPEP 4ビキア菌株の形成

#### 1. P. バストリス遺伝子置換ベクターpDL521の形成

"pop-in/pop-out"方法による宿主PEP 4遺伝子の破壊によるP. バストリスのPEP 4欠失(PEP 4-)菌株の発生に、ベクターpDL521を用いた。この方法では、小欠失を含む欠陥PEP 4遺伝子を宿主PEP 4座に加え、PEP 4座から機能性PEP 4遺伝子を除去する(すなわち、pop-in/pop-out)。

pDL521は2工程で形成した。最初に、pDL323の2. 2 kb EcoR I/SacIフラグメントと、pPU205の2. 2 kb SacI/PstIフラグメントとを三方向結合(three-way ligation)によって結合させて、中間体プラスミド、pDL501を形成した。これら3フラグメントは次のようにして得た。P. バストリスURA3遺伝子を含むpPU205(図8)をPstIとSacIによって消化させた。URA3遺伝子を含む2. 2 kb PstI-SacIフラグメントをゲル単離し、DESIペーパーを用いて精製した。完全PEP 4遺伝子中に存在する0. 5 kb NcoIフラグメントを欠いた欠陥PEP 4遺伝子を含むプラスミドpDL323(図11参照のこと)をEcoR IとSacIによって消化させた。欠陥PEP 4遺伝子を含む2.

#### b. GS 4-2の形質転換とPEP 4菌株の発生

プラスミドpDL521をNotIによる消化によって直鎖化した。PEP 4遺伝子から配列が欠失して、この遺伝子を不完全にする部位の5'に隣接して、NotI部位を配置する。NotIフラグメントの両端はGS 4-2内の内因性PEP 4遺伝子の配列に相合であり、このことはPEP 4座における相同的組換えによるフラグメントの組込みを促進する。

*His-Ura*菌株GS 4-2を、スフェロプラスト方法に従って、NotIによる消化によって直鎖化したpDL521-20 μgによって形質転換させた。形質転換体をそれらがウラシルを欠いた培地で増殖するか否かによって選択した。これらの形質転換体の12種を取り上げ、これらの形質転換体から単離した(実施例VII, B, 3に述べるように)ゲノムDNAをSaiIによって切断し、0. 8%アガロースゲル上で電気泳動を受けさせた。このDNAをニトロセルロースフィルターに移し、PEP 4遺伝子の放射能標識1. 2 kb EcoRV/XbaIフラグメントによって調べた。ゲノムDNAのサンプロットハイブリッド化パターンに基づいて、PEP 4座に組込まれたpDL521を有するよう見える2菌株、GS 4-2521-3とGS 4-2521-4をさらに選択するために選んだ。これらの菌株はURA3マーカー遺伝子を含み、このマーカー遺伝子の片側には無効の、完全なPEP 4遺伝子を有し、他方の側には欠陥PEP 4遺伝子(配列の~0. 5 kbを欠く)を有する。この形態のPEP 4座はPEP 4遺伝子の2コピーの間の組換えを可能にし、PEP 4遺伝子の一方とURA3遺伝子との脱離を生ずる(すなわち、pop-out)。この2種のPEP 4遺伝子のいずれの一方もこの組換えイベントから脱離する(breeding)ことができる。2種PEP 4遺伝子間の組換えが生ずるかどうか、また何時生ずるかを確認するために、菌株GS 4-2521-3とGS 4-2521-4と5-FOAを含むYPD培地上で連続10倍希釈法で培養した。*Ura*-菌株のみが5-FOAの存在下で増殖し、従って、このような培地での増殖が所要の組換えイベントの発生を実証する。5-FOA含有培地で増殖することができる菌株はPEP 4遺伝子の2コピー間の組換えによって発生するウラシル要求型であった。*Ura*-コロニーは30°Cにおける1週間の培養後に5-

2 kbフラグメントをゲル単離させ、DESIペーパーを用いて精製した。pUC19のEcoR I/PstIによって消化させた。3フラグメント(pUC19のEcoR I/PstI-消化フラグメント0. 02 μg、pPU205の2. 2 kb PstI/SacIフラグメント0. 02 μg、pDL323の2. 2 kb EcoR I/SacIフラグメント0. 02 μg)の三方向結合で結合させた。この結合ミックスを用いて、大腸菌MC1061を形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーをNcoI消化コロニー-DNAの分析によってスクリーニングした。正確に結合したフラグメントをpDL501と名付けた。次にpDL501をSacIによって消化させ、ウシアルカリホスファターゼによって処理し、0. 02 μgをSacI消化pEP202から単離された1. 9 kb SacIフラグメント0. 02 μgと結合させ、DE81ペーパーを用いて精製した。これはpDL501中の欠陥PEP 4遺伝子の3'末端にさらにPEP 4ランギング配列を加えて、P. バストリス宿主IGF-Uの形質転換中の内因性PEP 4遺伝子による組換えのためにさらに多量の相同配列を保証した。この結合ミックスを用いて、大腸菌MC1061を形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーからのDNAをBglIIとSpeIによって消化させ、pEP202からの添加SacIフラグメントの存在を示す特異的な0. 8 kbフラグメントの存在に関してスクリーニングした。正確なプラスミドをpDL521と名付けた(図14参照)。

#### 2. GS 4-2のpDL521による形質転換

##### a. GB4-2の発生

pop-outプロセスによるPEP菌株の発生に宿主として、P. バストリスのURA3菌株が必要であった。ウラシルを補充した5-フルオロオロチ酸培地(0. 67%酵母抽出培基、2%寒天、2.36グルコース、7.50 ng 5-FOA/1及び48 mg ウラシル/1)における普遍的(general) HIS-P. バストリス宿主菌株GS 115の10<sup>4</sup>細胞の直接培養によってURA3菌株を発生させた。30°Cにおける1週間のインキュベーション後に、平板上で増殖したコロニーを単離した。このHIS-Ura-菌株をGS 4-2と名付けた。

FOA含有平板上に出現した:これらのコロニーの中の10コロニーはGS 4-2521-3から誇導されたものであり、これらのコロニーの中の14コロニーはGS 4-2521-4から誇導されたものである。

##### 3. 形質転換体の特性化

*Ura*-形質転換体コロニーの14コロニーを精製し、各々からゲノムDNAを形成し、EcoR IとEcoRVによって消化させ、0. 8%アガロースゲル上で電気泳動を受けさせ、ニトロセルロース上にプロットし、P. バストリスPEP 4遺伝子の放射能標識1. 2 kb XbaI/EcoRVフラグメントによってハイブリッド形成した。このようにして分析した14単離体の中の7単離体からのDNAは完全PEP 4遺伝子に存在する~0. 5 kbの配列を欠いた欠陥PEP 4遺伝子のみから成るPEP 4座と一致するハイブリッド化プロファイルを有した。これらの菌株の中の2種がGS 4-2521-3とGS 4-2521-4であった。

##### 実施例VIII : P. バストリスのPRB-1遺伝子の一部のクローニング

プロテイナーゼB遺伝子、PRB-1はS. セレビジエにおける液胞セリンエンドプロテアーゼをコードする [Moehle等, Mol. Cell. Biol. 7: 4380-4399 (1987)]。同様の遺伝子の一部をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)遺伝子増幅方法を用いてP. バストリスからクローニングした[例えば, Gould等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1934-1938 (1989)を参照のこと]。種全体に推持される、プロティナーゼBタンパク質の領域をコードするPRB-1遺伝子配列への相合性を有する補遺オリゴヌクレオチド(Moehle等, 上記文献)をP. バストリスPRB-1 DNAのPCR増幅にプライマーとして用いるために合成した。このオリゴヌクレオチドは次の配列を有した:

オリゴヌクレオチド 1 :

5'- GATAGAATTCTGCAG GGT AAT GGT CAT CGT ACT CAT TGT GC-3'  
                                  A                   A                   A           G  
                                  C                   C                   C           C  
                                  C                   C                   C           C  
                                  C                   C                   C           C  
                                  A

オリゴヌクレオチド 2 :

## 特表平6-506117 (40)

配列を Sanger ジデオキシン方法を用いて発生させ (Sanger 等、上記文献)、配列番号 5 に示す。P. パストリス PRB-1 遺伝子のこの配列は S. セレビジエ PRB-1 遺伝子の配列に対して 74% の相似性を有する。

### 実施例 IX : P. パストリスの PRB-1 菌株の発生

P. パストリスの PRB-1 菌株の発生に用いるために、プラスミド pDR9 11 を形成した。このベクターは P. パストリスの PRB-1 菌株の内部部分を含み、これは P. パストリスの PRB-1 菌株の形質転換に用いる場合に、宿主ゲノムに PRB-1 座において組込まれ、PRB-1 遺伝子の 2 種の不完全な非機能性コピーを形成する。ベクター pDR9 11 は P. パストリスの URA3 常在菌株に選択性マーカーとして用いるために完全な機能性 P. パストリス URA3 遺伝子をも含む。

P. パストリスの PRB-1 菌株の発生に用いるために、プラスミド pDR9 11 を形成した。このベクターは P. パストリスの PRB-1 菌株の内部部分を含み、これは P. パストリスの PRB-1 菌株の形質転換に用いる場合に、宿主ゲノムに PRB-1 座において組込まれ、PRB-1 遺伝子の 2 種の不完全な非機能性コピーを形成する。ベクター pDR9 11 は P. パストリスの URA3 常在菌株に選択性マーカーとして用いるために完全な機能性 P. パストリス URA3 遺伝子をも含む。

### A. pDR9 11 の形成

pPRBPP 中の P. パストリスの PRB-1 遺伝子フラグメントを PstI と SphI による pPRBPP の制限消化によって単離させた。この反応混合物を 0.8% アガロースゲル上に負荷させ、0.5 kb フラグメントを DE81 ベーバーによって精製した。

この 0.5 kb フラグメントを直鎖状形のプラスミド pPU203 に、P. パストリス URA3 合成 pUC ベースドプラスミドに結合させた (図 7 参照)。プラスミド pPU203 を SphI と PstI による簡便によって直鎖化し、~10 ng をビキア DNA フラグメント ~100 ng と結合させた。この結合混合物を用いて大腸菌 MC1061 をアンピシリン耐性に形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーを特徴的なフラグメントに関する PstI / SphI 消化コ

増幅された DNA フラグメントのシャトル プラスミドへのサブクローニングを促進するために、各オリゴヌクレオチドはその 5' 末端に 1 個以上の制限エンドヌクレアーゼ認識部位をも含んだ：オリゴヌクレオチド 2 では SphI 部位、オリゴヌクレオチド 1 では PstI と EcoRI の両部位。

PCR 反応培地は T. E. (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 2 μl 中の P. パストリス (NRRL Y-11430 株) ゲノム DNA 100 ng と、オリゴヌクレオチド 1 10 μl と、オリゴヌクレオチド 2 10 μl と、dGTP, dCTP, dATP 及び dTTP の 1.25 mM 液度 1.6 μl と、10×緩衝液 (500 mM KCl, 1.0 mM Tris-HCl, pH 8.3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) 1.0 μl と、0.1% ゼラチンと、水 7.0 μl と、5 単位/μl Tag DNAポリメラーゼ 0.5 μl とから成るものであった。溶液を 94°C において 2 分間加熱した。31 回反復される PCR 循環反応は 96°C における 2 分間の変性と、50°C における 1 分間のアニーリングと、72°C における 3.5 分間の重複を含むものであった。

この PCR の生成物をアガロースゲル上の電気泳動に供し、オリゴヌクレオチド 1 と 2 に対応する位置頃の PRB-1 遺伝子の増幅生成物に予想されるサイズ (~500 bp) のフラグメントを DE81 ベーバー上で単離させ、EcoI と SphI によって消化させ、アガロースゲル上の電気泳動に供した。500 bp フラグメントを DE81 ベーバーによって単離させ、pUC19 10 ng に結合させた、この pUC19 はポリリンカーネートで EcoI と SphI によって消化されて、直鎖化されたものである。この結合ミックスを用いて、大腸菌 MC1061 細胞を形質転換させた。アンピシリン耐性の形質転換体からの制限酵素消化プラスミド DNA を正確な 500 bp EcoI-SphI フラグメントの存在に関して分析した。1 コロニーのみが pPRBPP と名付けられた、正確なプラスミドを含む。

pPRBPP に含まれる P. パストリス PRB-1 遺伝子のクローニング部分の

DNA の分析によってスクリーニングした。正確なプラスミドを pDR9 11 と名付けた (図 15 参照)。

### B. GB4-2 の pDR9 11 による形質転換

P. パストリスの PRB-1 菌株を形成するために、BglII による消化によって直鎖化された pDR9 11 による標準スフェロプラスチ形質転換によって、GS4-2 を形質転換させることができる。Ura<sup>r</sup> 形質転換体からの DNA のサンプロットハイブリッド化は、PRB-1 座の破壊によって形成される PRB-1 菌株の確認を可能にした。形質転換体のプロティナーゼ B 活性分析 [例えば、Jones 等の Genetics 102: 665-677 (1982) を参照のこと] は、菌株のプロティナーゼ B 缺失をさらに証明する。

### C. P. パストリスの prb-1, pep4 菌株の発生

GS4-2521-4 の单離体である P. パストリス GS4-2521-4-5 の pep4, ura3, his4 菌株の PRB-1 遺伝子 (実施例 V-1 参照) を、BglII による開裂によって直鎖化されたベクター pDR9 11 による形質転換によって破壊した。Ura<sup>r</sup> 表現型を有する形質転換体を選択して、サンプロットハイブリッド形成によって分析した。予想されるハイブリッド形成パターンを示す特定形質転換体を MG18 と名付けた。この菌株を IGF-1 の発現のための宿主として用いた。IGF-1 発現菌株を C+IGF816S1 と名付けた。

本発明をそのある一定の好みの実施態様に関して詳述したが、ここに述べ、特許請求する本発明の要旨と範囲内で変化と変更が行われることは理解されよう。

### 配列表

#### 配列番号 1 :

##### (1) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 2032 基基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 頭の数 : 不明

(D) トポロジー : 不明

##### (2) 配列の構造 : cDNA

##### (3) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : CDS

(B) 存在位置 : 236.. 1468

##### (4) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : 成熟ペプチド

(B) 存在位置 : 236.. 1468

##### (5) 配列 : 配列番号 1 :

GAAATCCATAA TGTGGTGGATY AGCTTAATCGT CGGGATAGGC AATAGCTGTT TGGGGCGATTC	60
AAATGCCACCTT GCTCTTATAGC GTAAAGTACCT TGACCGATAAA GGTGGCAACTT ATTTCAGAAC	120
ANGGAGGCCA CCTTCTCTTTA TCTGTAACTGC TGTGGAADCA AGCATCTTTA CTAGAGGAGCA	180
TCTAAACCAT TTTACATCTT ACAGTTTCCAT TCTCTAAATAA CTGATATAATC ATTTAAAG	240
ATG ATA TTT GAC CGT ACT AGC ATG TCA ATT GCC ATT CCT TTT CTC TCT Met Ile Phe Arg Gly Thr Ser Ser Ile Ala Ser Gly Leu Lys Ser Ser	300
Met Ile Phe Arg Gly Thr Ser Ser Ile Ala Ser Gly Leu Lys Ser Ser Ile Lys Ile Met	360
ACT CTA CGT ATT CCT GCA GCC AAA CCT CAT TCT CCT CCT AGG ATA CRC Thr Leu Cys Ile Gly Ala Glu Ala Lys Val Lys Ser His Lys Ile Lys	420
AGC CAT CCA CTC TCA GAA ACT TTA AAA CGC GCG ATT TTT DCG CGG TAT Ser Leu Pro Val Ser Glu Thr Leu Lys Ala Asn Pro Ser Glu Cys Tyr	480
GTC TCT CGT CTC GAA CAT AAA TAT GTC TCT CTC TTC AAC GAA CAA AAT Val Ser Ala Leu Glu His Lys Tyr Val Ser Leu Phe Asn Glu Asn Asn	540
GCT TTG TCC AAC TCC ATT ATT ATG TCT CGG CAA GAT GGT TTT GCG CCT Ala Leu Ser Lys Ser Asn Phe Met Ser Glu Glu Asp Ser Glu Phe Ala Val	600

特表平6-506117 (4)

GAA CCT TCG CAT GAT GCT CCA CTT ACA AAC TAT CTT AAC CCT CAG TAT Glu Asn Ser His Asp Ala Pro Leu Thr Asn Tyr Leu Asn Ala Glu Tyr 85 90 95	526	ATT GCT TTG CCC ACT GGC CTA CCT OAA ATT GTC ATC GCA AAA ATT GOT Ile Ala Leu Pro Ser Gly Leu Asp Ile Leu Asn Ala Glu Ile Gly 105 110 115 120 125	1196
TTT ACT GAG GTC TCA TTA CCT ACC CCT CCA CAA TCO TTC AAC GTC ATT Phe Thr Glu Val Ser Leu Gly Thr Pro Pro Glu Ser Phe Val Ile 100 105 110	574	GCT ACC AAC GGT TGG TGT GGT CAA TAC GCT GTG GAC TGT GAC ACT AGA Ala Thr Lys Gly Trp Ser Gly Cys Tyr Ala Val Asp Cys Asp Thr Arg 115 120 125 130 135 140	1346
CTT GAC ACA CGA TCC TCC ATT TTA TGG CCT CCT ACC AAA GAT TGT GGA Leu Asp Thr Gly Ser Ser Asn Leu Trp Val Pro Ser Lys Asp Cys Gly 115 120 125	622	GAC TCT TTG CCA GAC TTA ACT TTA ACC TTC GGC GGT TAC AAC TTT ACC Asp Ser Leu Pro Asp Leu Thr Leu The Phe Ala Gly Tyr Asn Pro Thr 130 135 140 145 150 155	1394
TCA TTA CCT TGC TTG CAT CCT ACC AAC TAT GAC GAT GAT AAC TGT CCT Ser Leu Ala Cys Phe Leu His Ala Lys Tyr Asp His Asp Glu Ser Ser 130 135 140	670	ATT ACT GCA TAT GAC TAT ACT TTG GAA CCT TGT GGG TCA TGT ATT ACT Ile Thr Pro Asp Tyr Asp Tyr The Leu Glu Val Ser Gly Ser Cys Ile Ser 135 140 145 150 155 160	1342
ACT TAT AAC AAC ATT CCT ACT ACC TTT GAA ATT AAC TAT GCA CCT CCT GGT The Tyr Lys Ala Ser Ser Asn Phe Glu Ile Asp Tyr Gly Ser Ser Gly 145 150 155 160	718	GCT TTC ACC CCC ACT ATG GAC TTT CCT CCT GCA ATA GGT CCT TTG GCA ATC Ala Phe Thr Pro Met Asp Glu Pro Ile Gly Pro Leu Ala Ile 170 175 180	1390
TCC ATG GAA GGG TAT CCT TCT GAC GAT GTC TTO GAA ATT GGG GAT CCT TGC Ser Met Glu Gly Tyr Val Ser Glu Asp Val Ile Ile Gly Asp Leu 165 170 175	754	ATT GGT GAC TCG TTG AGA AAA TAT TAC TCA CCT TAT GAC GTC GGC Ile Gly Asp Ser Phe Leu Arg Lys Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Gly 185 190 195 200 205 210	1418
ACC ATT CCC AAA CCT GAT CCT CCT CCT GAC GGG ACA TCA GAA CCT CCT GGG TGC Thr Ile Pro Lys Val Asp Phe Asn Glu Asn Thr Ser Glu Pro Gly Leu 180 185 190	814	AAA GAT GCA GTC TTA GCC AMG TGT ATT TAGCCAGAAC TAAAGAGTC Lys Asp Ala Val Cys Leu Ala Lys Ser Ile 195 200 205 210	1488
CCC TTC CCT TTT GGC AAA ATT GAC GGA ATT TTG GGG CCT CCT TAT GAT Ala Phe Ala Phe Gly Lys Asp Phe Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Asp 195 200 205	862	TCTGCTGAA TTTATTCGTT ACTTATCAAGG TACTUAGATG TGAGKGAATA TATOTTAGG TATTTTTTTT TACTTTTCTT CCTATAACTG ATCTTCAGTA CCTGATTTCTT TGTGAGCTAC CTTGACAGGG CCOCATAAGT GATATGCTGT ACTGCTCTATG CAAATTTGG CTGCTCCATT GATAGGGCTA TAAAGACCC ACCTGCTCTT CTTTAAATT CTCTCTTAAC TGTGCTGAAA ATCATCTTCC AAGCAAAATTC GAGTTAAAT CTTATGGGTT GCTAATCAA GGATATGCT GCTGTTATATG AGTTTTTCTT TTACCTTTTCTT ACTAATCACT TTTACAGAO AGGARCTCT TTCTCTGAGT CCAGATAGGA CTAATACTG GAGACCTGG CCTCCCTATT TGGCTGAAAG GCAGTCGGGT ACAGATAGGG AGACTATTC CTATGATGCA GATGCTTGGG CTGCTTTCTC TTTGTGCAAA TCTCATTTG GARATITGAGG CTGGGGAGAG GATGGGAGAG CTGGAGCTC AGAC 2028	1748
TCA ATA TCA GTC ATT AAC ATT CCT CCT CCT ATT TAC AAC TAC CCT GAT CCT Ser Ile Ser Val Asn Lys Ile Val Pro Pro Ile Tyr Lys Ala Leu Glu 210 215 220	910	TCA ATT CCT GTC TCC GAA CGC AAA TTT GGC TCC TAC TGA GAC CCT GAT CCT Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro Lys Phe Asn Phe Tyr Leu Gly Asp Thr 225 230 235 240	958
TTC CAT CTC CCT GAC GAA CGC AAA TTT GGC TCC TAC TGA GAC CCT GAT CCT Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro Lys Phe Asn Phe Tyr Leu Gly Asp Thr 235 240	1004	GAC AAA CAT GAA TCC GAT CCC GGT TTG GGG CCT ACA ATT GGT GGT GTC GAC Asp Lys Asp Glu Ser Asp Gly Leu Ala Thr Phe Gly Cys Val Asp 245 250 255	1004
AAA TCT AAC TAT CTA CGA AAC ATC ACC TCG TTG CCT GTC AGA AGA AGG Lys Ser Lys Tyr Glu Cys Ile Lys The Trp Leu Pro Val Arg Arg Lys 260 265 270	1054	AAA TCT AAC TAT CTA CGA AAC ATC ACC TCG TTG CCT GTC AGA AGA AGG Lys Ser Lys Tyr Glu Cys Ile Lys The Trp Leu Pro Val Arg Arg Lys 265 270 275	1054
GCT TAC TCG GAC GTC TCT TTG CAT CCT GTC GAT GGT TTG GAA CCT GAA TAT Ala Tyr Trp Glu Val Ser Phe Asp Gly Val Gly Ser Glu Tyr 275 280 285	1102	GCT GAA TTG CAA AAA ACT GGT GCA CCT ACC GAC ACT GGA AGG TCA TTG Ala Glu Leu Glu Lys The Cys Ile Ala Asp Thr Glu Val Arg Lys 290 295 300	1150

配列番号2 :

(1) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 410アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: タンパク質

(H) 配列: 配列番号2 :

```

Met Ile Phe Asp Gly Thr Thr Met Ser Ile Ala Ile Gly Leu Leu Ser
1      5      10      15
Thr Leu Gly Ile Gly Ala Glu Ala Lys Val Asn Ser Ala Lys Ile Ile
20     25      30
Lys His Pro Val Ser Glu Thr Leu Lys Glu Ala Asn Phe Gly Glu Tyr
35     40      45
Val Ser Ala Leu Glu Ile Lys Tyr Val Ser Leu Phe Asn Glu Glu Asn
50     55      60
Asn Leu Ser Lys Ser Asn Phe Met Ser Glu Cys Asp Gly Phe Ala Val
65     70      75      80
Glu Ala Ser His Asp Ala Pro Leu Thr Asn Tyr Leu Asn Ala Glu Phe
85     90      95
Phe Thr Glu Val Ser Leu Gly Thr Pro Glu Ser Phe Lys Val Ile
100    105    110
Leu Asp Thr Cys Ser Ser Asn Leu Trp Val Pro Ser Lys Asp Cys Gly
115    120    125
Ser Leu Ala Cys Phe Leu His Ala Lys Tyr Asp His Asp Glu Ser Ser
130    135    140
Thr Tyr Lys Asn Gly Ser Ser Phe Glu Ile Arg Tyr Gly Ser Gly
145    150    155    160
Ser Met Glu Gly Tyr Val Ser Glu Asp Val Leu Glu Ile Gly Asp Leu
165    170    175
Thr Ile Pro Lys Val Arg Phe Ala Glu Ala Thr Ser Glu Pro Gly Leu
180    185    190
Ala Phe Ala Phe Gly Lys Phe Asp Glu Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Asp
195    200    205

```

```

Ser Ile Ser Val Asn Lys Ile Val Pro Pro Ile Tyr Lys Ala Leu Glu
210    215    220
Leu Asp Leu Leu Asp Glu Phe Lys Phe Asp Ala Phe Tyr Leu Gly Asp Thr
225    230    235    240
Asp Lys Asp Glu Ser Asp Gly Gly Leu Ala Thr Phe Gly Cys Val Asp
245    250    255
Lys Ser Lys Tyr Glu Gly Lys Ile The Trp Leu Pro Val Arg Arg Lys
260    265    270
Ala Tyr Trp Glu Val Ser Phe Asp Gly Val Gly Ser Glu Tyr
275    280    285
Ala Glu Leu Glu Lys The Cys Ile Asp Thr Gly The Ser Leu
290    295    300
Ile Ala Leu Pro Ser Gly Leu Ala Glu Ile Leu Asn Ala Glu Ile Gly
305    310    315    320
Ala Thr Lys Gly Trp Ser Ser Cys Glu Tyr Ala Val Asp Cys Asp Thr Arg
335    340    345    350
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Thr Leu Thr Phe Ala Gly Tyr Asn Phe Thr
360    365    370    375
Ile Thr Pro Tyr Asp Tyr The Leu Glu Val Ser Gly Ser Cys Ile Ser
385    390    395    400
Ala Phe Thr Pro Met Asp Phe Pro Glu Pro Ile Gly Pro Leu Ala Ile
395    400    405    410
Ile Gly Asp Ser Phe Leu Arg Lys Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Gly
405    410    415    420
Lys Asp Ala Val Cys Leu Ala Lys Ser Ile
425    430    435    440

```

特表平6-506117 (42)

配列番号3 :

(1) 配列の特徴 :

- (A) 配列の長さ : 2688 基塩対
- (B) 配列の型 : 構造
- (C) 基の数 : 不明
- (D) トポロジー : 不明

(2) 配列の種類 : c DNA

(ix) 特徴 :

- (A) 特徴を表す記号 : CDS
- (B) 存在位置 : 643..1431

(ix) 特徴 :

- (A) 特徴を表す記号 : 成熟ペプチド
- (B) 存在位置 : 643..1431

(xi) 配列 : 配列番号3 :

CTGCAGGAAAT CGGGGATGATG CCGACCTTGTG CCAATTGACTG AACAGTCCTAC	60	GTC AGA ACA ACT AAA GAA TTA TTG GAG CTT CTA GAT AAA TTC GGC CCA Val Arg Thr Thr Lys Glu Leu Leu Glu Lys Leu Lys Lys Leu Gly Pro	798
TACAAATGCC ACGCATCTTAA AGGATGAAGG CAGTCATCTT TGGAGCTTAA CCATTGAAAT	120	40 65 90 Phe Ile Cys Leu Ala Lys Thr His Ile Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr II 60 85	846
GATGGGAAAC ACTACTAAGA TTAGTGAGCT GTTCAAGAAA AGTCTGGATT AGTCTGGGAC	180	TAT GAT GCA ACT ATT CTG CCT TTA TTG GAA CTA TCA AAC AAA CAA TAG Tyr Asp Glu Thr Ile Leu Pro Leu Leu Glu Leu Ser Lys Lys His Lys	894
AATGAACTTT ATCTTACAAA ATATGGGGTT AACCTCTTAC CTGTTGCTAC ATANGTGGT	240	70 78 90 TTC TTA ATT TTT GAG GAC AGA AAC TTT GCT GAT ATA GGC AAC ACT GTC Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Thr Asp Ile Asp Glu Ser Lys Val	942
TTCGTTCTTC GAAGCTTCA CCAGCTCTCT CACTGCTCTT GAGGACCTT TTGCAACACT	300	98 90 98 AAG CAT CAA TAT CAA GAA GGT GTC TAC AAC ATT GCA AAC CAA TAG GCA GAT Lys His Glu Ser Glu Glu Val Tyr Lys Ile Ile Glu Glu Trp Ala Asp	990
TCTTGATGCA GCGCTCCCTT TTAGAGCTCA ATCTTGTAGA TCTTAATACA TTGACACAGT	360	105 110 115 ATT ACA ATT CCT CCT GGT GTC ATT GCT GCA ATT CTA AAC GGC CTA Ile Asn Asn His Glu Glu Ser Glu Ile Glu Ser Glu Ile Val Ile Glu Leu	1038
CTGTTAAACA TTGGCTTAACTTAAATGGGAGT AAAGACGGAT GAACTCTTTC ATTGGTTTTT	420	120 125 130 AAG GAA ACT GTC GAA ATT GCA AAC TCA GAC AMG GAA TTC GTC ATT GGC Glu Glu Thr Val Glu Ile Ala Lys Ser Asp Lys Glu Phe Val Ile Glu	1182
GTTCACGGG TTCTCTGAA TCTTGCTGTT CTTCAGGTTT CTAATGGTTT GTCAGGTT	480	145 170 180 GAA ATT CCT CAA ATT CCT GCA GAA GGT GCA GAT GAA GGG TTC GTC ATT Phe Ile Ala Glu Ser Met Glu Glu Glu Asp Glu Glu Phe Asp Trp	1236
GTACTGGTTT CGGGCTAGGT TAGGACTTGC TCTCTCTTGG ACCAGTTTTT GTCAGGTT	540	185 190 195 ATT ATT ATG ACA CCA CCT GGT GGT TTC GAT GAC ACT GGT GAT GGT CTA Ile Ile Met Thr Pro Glu Val Glu Ser Asp Thr Glu Asp Ala Leu	1279
ACAAAGAAA TTITTTGAC GTCAGCGTC GTCRATCTAC TCCAGCTAA TCTAGCTCAA	600	200 205 210 GGC CAA CAA TAT CAA ACA GTC ACT GCA ATT GTC ATT TCC ACT GGC ACT GAC Gly Glu Ala Tyr Arg Thr Val Ser Glu Val Phe Ser Thr Glu Thr Asp	1328
TGAGTAAACA TCAACCTGAT CAAGGGATA GATACCTAGA CA ATT CCT CCC AGT	664	215 220 225 ATC ATA ATC GTC CCT CCT GGT TTC GTC AAC GGC AGA CAT CCC TTA Ile Ile Ile Val Glu Arg Dly Leu Phe Glu Lys Glu Arg Asp Pro Leu	1374
Met Ala Arg Ser 1 TYR ALA GLU ARG ALA HIS GLU SER PRO VAL ALA ARG ARG LEU 9 10 15 20 30	702	235 240 AAA GAA GGT CAA CGG TAT AGA AAA GCT GGG TGG GAA CCT TAC CAA ATT Lys Glu Glu Arg Tyr Arg Lys Ala Glu Glu Trp Glu Glu His Tyr Glu Ser	1422
TTT GCG CTT ATG GAA CAG AAA CAG AGT AAC CTA TCG GCA TCA GTC GAC	780	245 250 255 260 ATT CTG AGG TAAATTACAA STATUTACAG CGGCTTCATT GTTTGGGGCG Ile Leu Arg	1471
Phe Ala Leu Met Glu Glu Lys Glu Ser Asn Leu Tyr His Ser Val Asp	25 30		

ATTCACGGA ATCGATCTTC ATTCATCAGG CTGCAATTTC GAGGGAGAT TTCAGAACGG	1831		
AGAAACCCCC CGGGATOTTC TGGAGATGTTA CTTCAGGCT TCTTAACGAA CCCTTCTTAA	1891		
ACCCAGGCGG TCCAAGAGAG TCTGAGCTTC TCTGTTGACG TCAACGACTG CTGGAAATATA	1892		
TCTAAGTATG ATCGCTTAAATA TAGTGCGGAT TAACTTCTTCT TATCGCCAGG GTCCTCGTGT	1711		
AAATATATCCA ACCTCTTCCAC CTTCTCTTAA TATCTTGTACT GACTCTTACA AAATGCGGAT	1771		
TCGACGCTA GTGACGAGA TCGCGCGTA GCACAGGCCA AAAGGATATAA AGTGTGCTTC	1821		
AGGATATTTT CACTTTCCTG TTTCAGCTG TCACCTTGGG GCTTCCTGG AGAACGATTTT	1891		
TCTACCTGAT CAACTCTTC GATAGTTGCTG CGGGATCTTC ATTCATCTTC ATTCCTTATG	1891		
GCTTCGAAATG TTGTCGAATA TATGCGAAG GATGCGCTT CTTTGACGAG ATCGACAGGG	2011		
TACCCGACAA ATACCCCCCG AAACGCTTAACT TTTTTTTGTTT TATGAGAGCC GTCAGGATCT	2071		
AAAGTTGCTAT TCTTGGGDDC AATTAAGCTGAG GAGGCTTAACT ATCGGGGATATA TCTGAGCTCA	2131		
ATTOGGCGCG CTCACCAAGA CTGGCCGAGCT CGACCTGAGA ACCGGCTGAG AAATACATCC	2181		
ACTAGCTTG CTGTTGCTAT CGATCTTCCG CTTTGGACGCT CACTATATG CTCACGACAT	2281		
GATAAAATCC TTTGCTGAAAG TACGATTCGG ATCACGAGAT CGGGTACGAC TGGCTACGAG	2311		
ACCTGGTTG CTGTCAGACTC CCACACCCGG GTTTCGACGG CTCGCTAAACAA TAGAGCTGG	2371		
TTCGAGCTGA AAATGGGCTG TAAGCTTGTAC CTTTGAAAG AGCTCCGAAAG AGATGCGGTA	2411		
TTGGTGGCAT CTGCTGAAA CGACTGGAGC GAAGAGCTTT CGCTGGGCTC CTGAGGTTAGA	2481		
GTGAGCTAA TTGCGCTAGA ACAGCTCTGA TCCGACGCTGT CGAGGAGAC ACCATCTGAC	2552		
TGTTTTGTT CCTGAGAGTA CGCTTGTATG ATTCATCTT CTTTGTCTATA CGTTTCTGCA	2631		
ACACAAATCCC AGACCTCTAC GAGGATCAGA CGGGCTTGA CGCTGGTGTATA TATGATTTA	2671		
TAACGGTACG GAGCTCG	2689		

配列番号4 :

(1) 配列の特徴 :

- (A) 配列の長さ : 2637 ベノミ
- (B) 配列の型 : アミノ酸
- (C) トポロジー : 団塊状
- (D) 配列の種類 : タンパク質

(e) 配列 : 配列番号4 :

Met Ala Arg Ser Tyr Ala Glu Arg Ala Asn Thr His Glu Ser Pro Val	1	5	10	15
Ile Arg Arg Lys Phe Ala Leu Met Glu Glu Lys Glu Ser Asn Leu Cys	20	35	40	45
Ala Ser Val Asp Val Arg Thr Thr Lys Glu Lys Leu Glu Lys Leu Asp	55	60	65	70
Lys Lys Glu Pro Phe Ile Cys Ala Lys Lys Thr His Ile Asp Ile Ile	75	80	85	90
Asp Asp Phe Thr Tyr Asp Glu Thr Ile Leu Pro Leu Glu Lys Leu Ser	95	100	105	110
Lys Lys His Lys Lys Lys Phe Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp	115	120	125	130
Gly Asn Thr Val Lys His Glu Tyr Glu Glu Glu Val Tyr Lys Ile Ala	135	140	145	150
Gln Trp Asp Ile Asp Ile Thr Asn Ala His Glu Val Ile Glu Ser Glu Ile	155	160	165	170
Val Lys Lys Glu Ala Ala Thre Glu Thr Thr Asp Glu Pro Arg	175	180	185	190
Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Glu Ser Ile Ala His	195	200	205	210
Gly Lys Tyr Thr Glu Glu Thr Val Glu Ile Ala Lys Ser Asp Lys Glu	215	220	225	230
Phe Val Ile Glu Phe Ile Ala Glu Asn Ser Met Glu Glu Glu Asp Glu	235	240	245	250
Glut Phe Asp Trp Ile Ile Glu Asn Ser Met Glu Glu Glu Asp Glu	255	260	265	270

特表平6-506117 (43)

Gly Asp Ala Leu Gly Glu Gln Tyr Arg Thr Val Ser Glu Val Phe Ser  
210 215 220  
Thr Gly Thr Asp Ile Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Phe Gly Lys Gly  
225 230 235 240  
Arg Asp Pro Leu Lys Glu Glu Glu Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp Glu  
245 250 255 260  
Ala Tyr Glu Asn Ile Leu Arg  
260

配列番号5:

(1) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 555 基基対

(B) 配列の型: 横継

(C) 線の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(2) 配列の種類: cDNA

(3) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 3...554

(4) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: 成熟ペプチド

(B) 存在位置: 3...554

(5) 配列: 配列番号5:

GT ATT CTD CGG GAA AAC GGC CGG AGT ACA CAT TGT GGT GGT ACC ATT	87
Ile Leu Glu Gly Asn Gly His Gly Thr His Cys Ala Gly Thr Ile	
1 5 10 15	
GCT TCT GAA ACC TAC GGT GTT GCC AAG AAG GCT ATT ATT GTT GGC ATC	98
Ala Ser Glu Ser Tyr Gly Val Ala Lys Lys Asn Val Val Ala Ile	
20 25 30 35	
AAG GTC TTG AGA TCT ATT GGT TCT GGT TCA ATG TCA CAT GTT CTG AAC	143
Lys Val Leu Arg Ser Asn Gly Ser Met Ser Asp Val Leu Lys	
35 40 45	
GCT GTT GAC TAT GGC ACC GAA TCC CAC TCG GAT GCT GTT AAA AGG GGC	191
Gly Val Glu Tyr Ala Thr Glu Ser His Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly	
50 55 60	

AAA AAG AAA TTT AAC GGC TGT ACC GCT AAC ATG TCA GTG DOT GGT GGT  
Asn Lys Phe Lys Gly Ser Thr Ala Asn Met Ser Leu Gly Gly Gly  
65 70 75  
AAA TGT CCT CCT TTG GAC CTT GCA GTC ATT GCT GCT ATT AAC ATT DGT  
Lys Ser Pro Ala Leu Ser Asp Leu Ala Val Lys Asn Gly  
80 85 90 95  
ATT CAC TTT CCC GTC GCA GCA GCT AAC GAA AAC GAA GAT GCT TGT AAC  
Ile His Phe Ala Val Ala Ala Gly Asn Glu Asp Glu Asp Ala Cys Asn  
100 105 110  
ACC TGU CCA GCA GCT GGT GAG ATT GCC ATC ACC GTC DOT GCA TCA ACC  
Thr Ser Pro Ala Ala Ala Glu Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Ser Thr  
115 120 125  
TTA TCA GAC GCT AGA GCT TAC TTT TCT AMG TAC GGT AAA TGT GTT GAC  
Leu Ser Asp Ala Arg Ala Tyr Phe Ser Asn Tyr Gly Lys Cys Val Asp  
130 135 140  
ATT TTC GGT CCA GGT TTA AAC ATT CCT TCT ACC TAC ACT GGT TCA GAT  
Ile Phe Ala Pro Glu Leu Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Thr Gly Ser Asp  
145 150 155  
GAC GCA ACT GCT ACC TTG TGT DOT ACT TCA ATG GGC AAG CCT CAT GGT  
Asp Ala Thr Ala Thr Leu Ser Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val  
160 165 170 175  
CCA GGC TTG CAT GCA GGC TTG GCA CTC G  
Ala Gly Leu His Ala Ser Leu Ala Leu  
180

配列番号6:

(1) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 184 アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

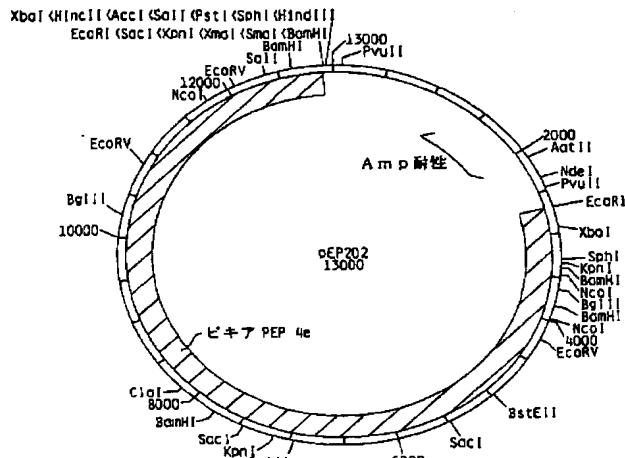
(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: タンパク質

(F) 配列: 配列番号6:

Ile Leu Glu Gly Asn Gly His Gly Thr His Cys Ala Gly Thr Ile Ala	15
1 5 10	
Ser Glu Ser Tyr Gly Val Ala Lys Lys Asn Val Val Ala Ile Ile	
20 25 30 35	
Val Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly Ser Met Ser Asp Val Leu Lys Gly	
35 40 45	
Val Glu Tyr Ala Thr Glu Ser His Leu Asp Ala Val Lys Lys Asn	
50 55 60	
Lys Lys Phe Lys Gly Ser Thr Ala Asn Met Ser Leu Gly Gly Lys	
65 70 75	
Ser Pro Ala Leu Asp Leu Ala Val Asn Ala Ala Val Lys Asn Gly	
85 90 95	
His Phe Ala Val Ala Ala Gly Asn Glu Asp Ala Cys Asn Thr	
105 110	
Ser Pro Ala Ala Glu Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Ser Thr Leu	
115 120 125	
Ser Asp Ala Arg Ala Tyr Phe Ser Asn Tyr Gly Lys Cys Val Asp Ile	
130 135 140	
Yme Ala Pro Glu Leu Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Thr Gly Ser Asp Asp	
145 150 155	
Ala Thr Ala Thr Leu Ser Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala	
165 170 175	
Cys Leu His Ala Ser Leu Ala Leu	
180	

済書(内容に変更なし)



1

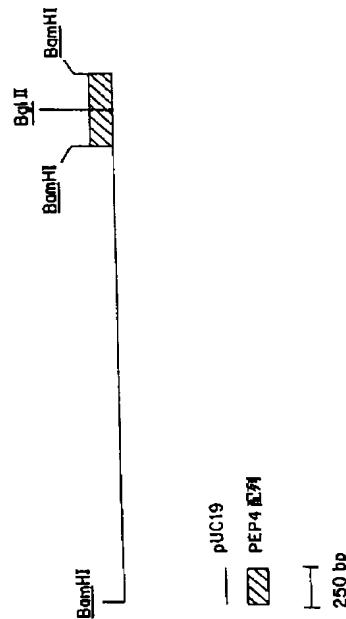


図2 DFR205の直線状制限地図

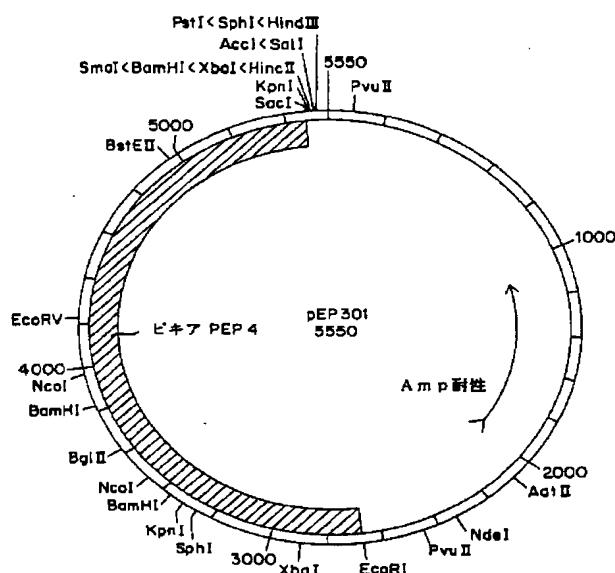
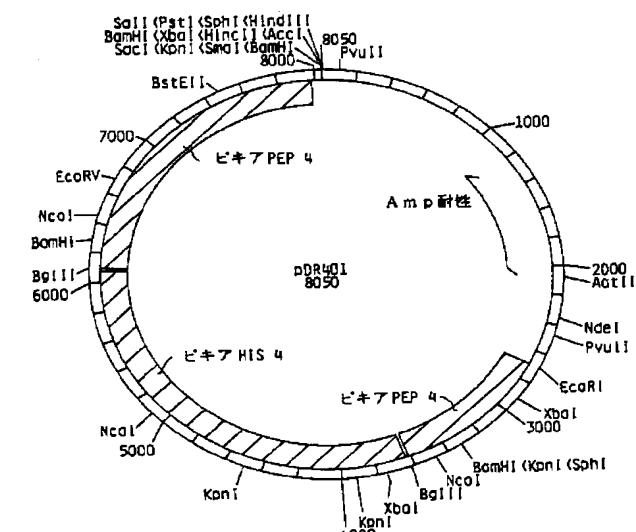


圖 3



4

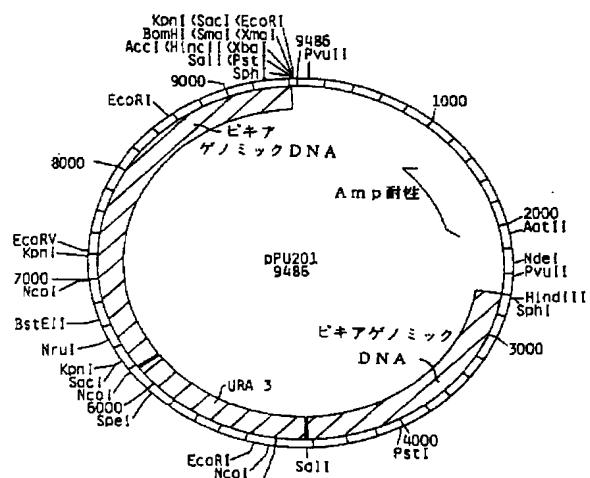
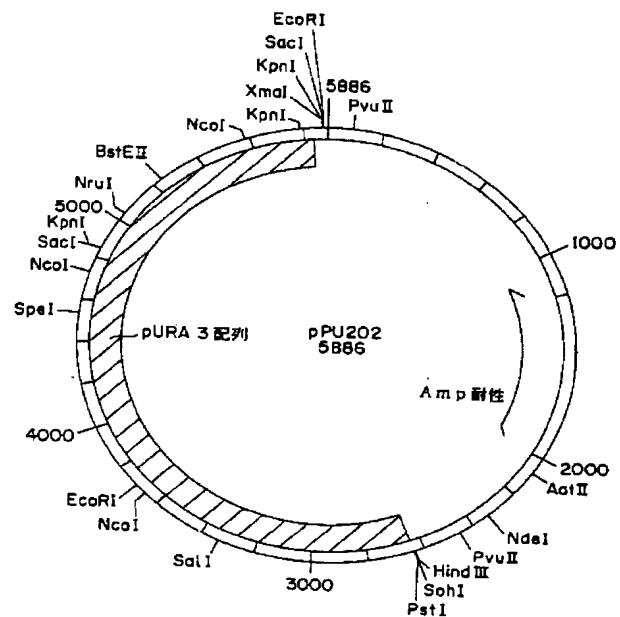
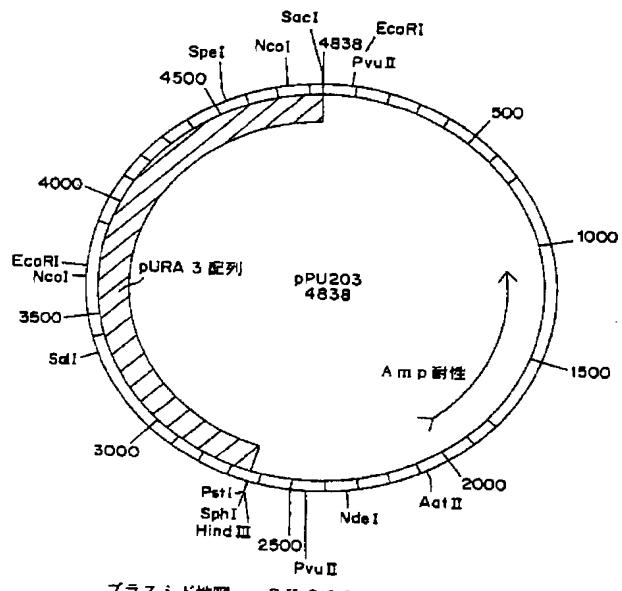


図5



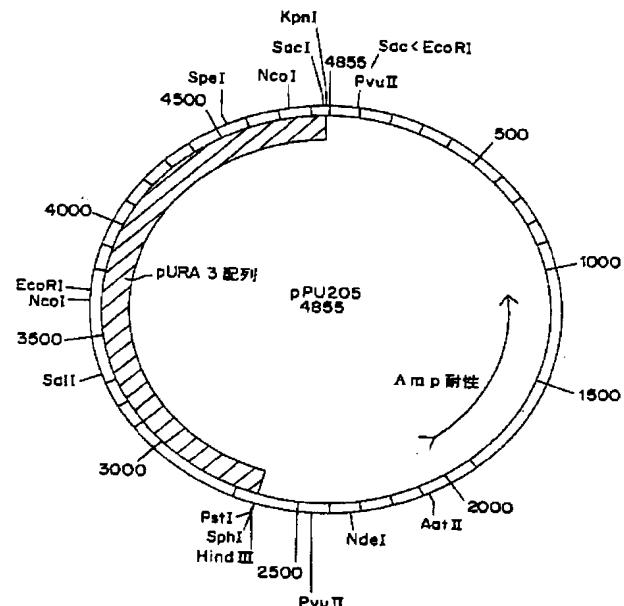
プラスミド地図: pPU202 配列: 1~5886

図6



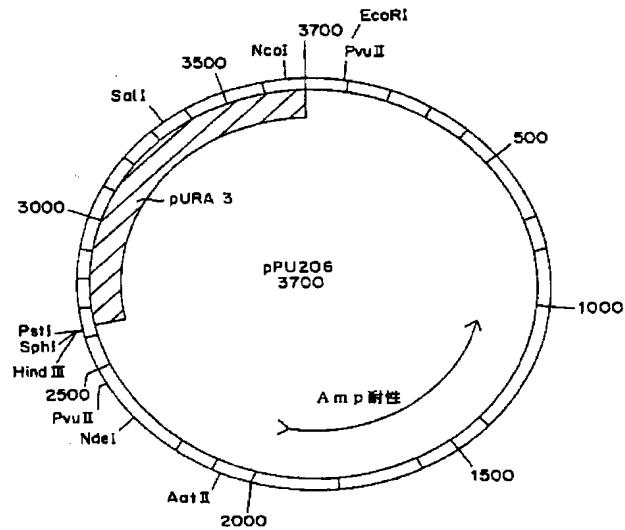
プラスミド地図: pPU203 配列: 1~4838

図7



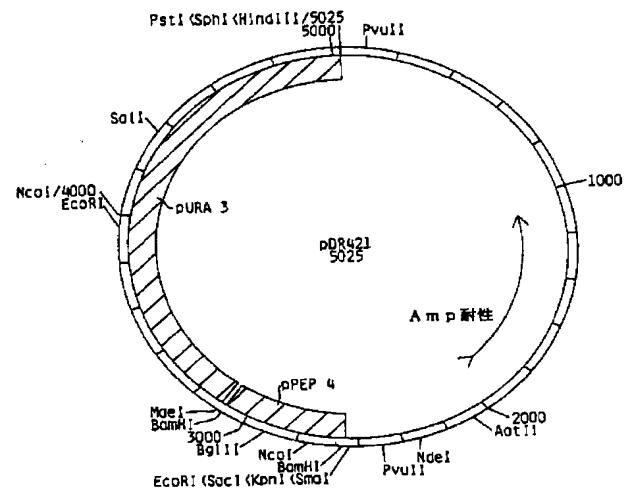
プラスミド地図: pPU205 配列: 1~4855

図8



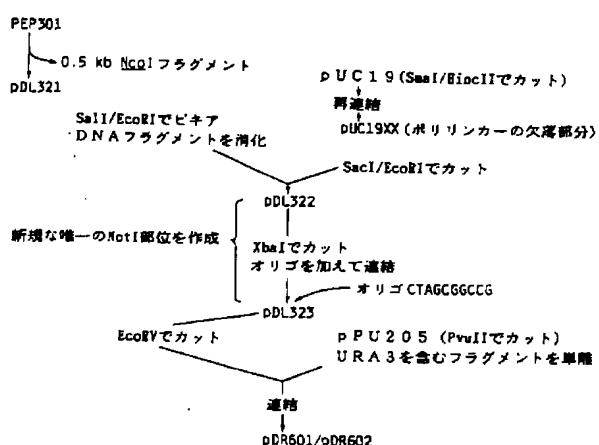
プラスベル地図：PPU206 配列：1~3700

四 9

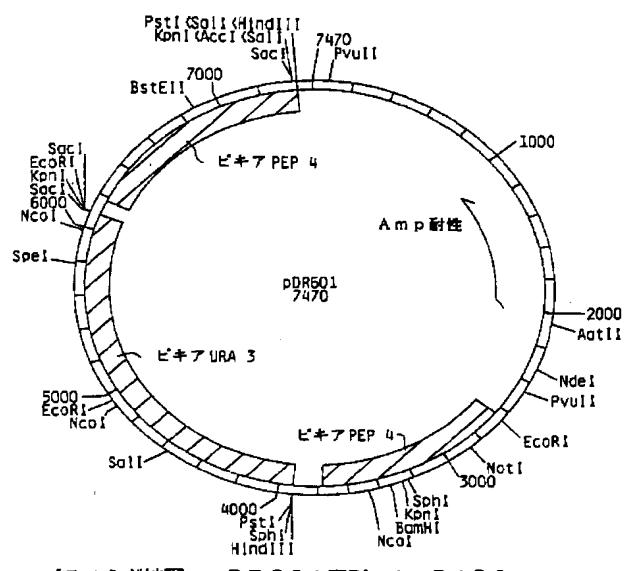


プラスミド地図: pDR421 配列: 1~5025

圖10

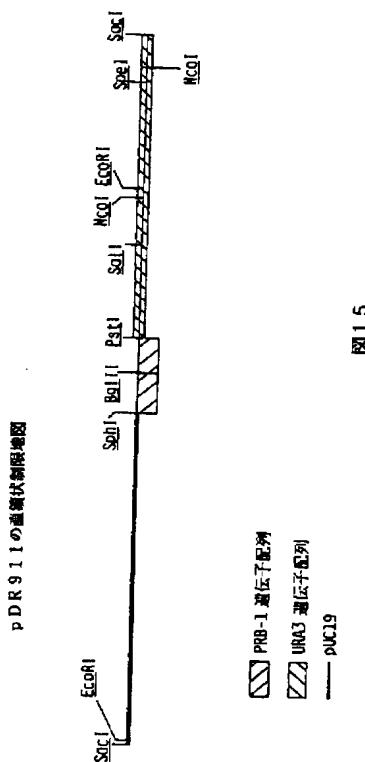
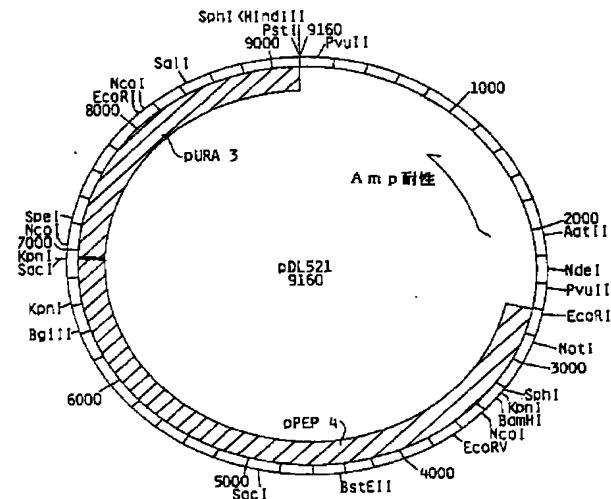
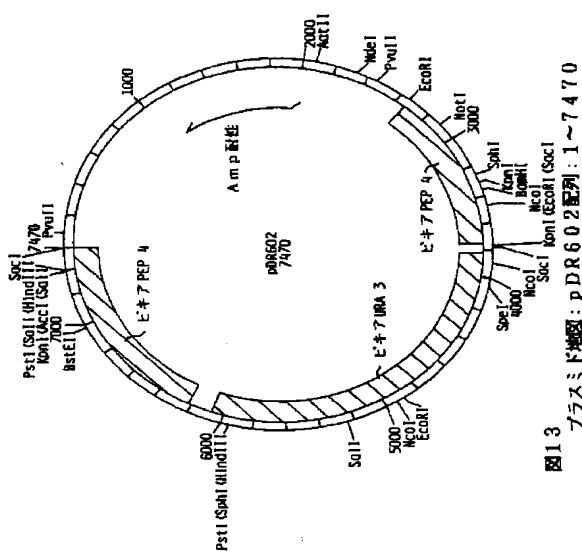


11



プラスミド地図: pDR601配列: 1~7470

図12

補正書の翻訳文提出書  
(特許法第184条の8)

平成5年9月14日

特許庁長官 麻生謙 謹

## 1. 特許出願の表示

PCT/US92/02521

## 2. 発明の名称

ピキア (*Pichia*) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子およびその使用

## 3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国カリフォルニア州92037, ラ・ホーラ,  
コースト・ブルヴァード・サウス 505  
名称 ザ・ソーカ・インスティチュート・バイオテクノロジー/  
インダストリアル・アソシエイツ・インコーポレーテッド

## 4. 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル 206号  
電話 3270-6641~6646  
氏名 (2770) 弁理士 湯浅義三

## 5. 補正書の提出日

平成5年6月6日

## 6.添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文

1通



## 請求の範囲

[請求項1]を補正し、請求項2および3を削除し、請求項4～7を新請求項2～5とし、請求項8を削除し、請求項9～15を新請求項6～12とし、請求項16を補正して新請求項13とし、請求項17を新請求項14とし、請求項18～20を補正して新請求項15～17とし、請求項21を新請求項18とし、請求項22～24を補正して新請求項19～21とし、請求項25を削除し、請求項26および27を新請求項22および23とし、請求項28を補正して新請求項24とし、請求項29～31を新請求項25～27とし、請求項32を補正して新請求項28とし、請求項33～39を新請求項29～35とし、請求項40を削除し、請求項41～48を新請求項36～43とし、そして新請求項44～47を加えた。]

1. ピキア属の菌株から得られる单链DNAフラグメントであって、直接又は間接的に前記菌株のタンパク分解活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする遺伝子を含み、タンパク質分解活性に影響を及ぼす産物をコードする該遺伝子がピキアPEP4遺伝子またはピキアPRB-1遺伝子である、上記DNAフラグメント。

2. 前記フラグメントがプラスミドpEP202の約1.6kb EcoRIフラグメントである請求項2記載のDNAフラグメント。

3. 前記フラグメントが、前記菌株のカルボキシペプチダーゼY活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする、プラスミドpEP301の約2.7kb EcoRI-SacIフラグメント又はその部分である請求項2記載のDNAフラグメント。

4. 前記遺伝子の前記核酸配列が配列番号2に記載されるアミノ酸配列と実質的に同じであるアミノ酸配列をコードする請求項2記載のDNAフラグメント。

5. 前記遺伝子の核酸配列が配列番号1に記載される核酸配列と実質的に同じである請求項2記載のDNAフラグメント。

6. 前記遺伝子の改質形が相同的組換えによるピキア属の酵母宿主中への導入に適する請求項1記載のDNAフラグメントであって、その発現産物がタンパク質分解活性に影響を及ぼす前記遺伝子の特定位において相同的組換えが生ずる

17. プロティナーゼBまたはプロティナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼY活性との欠損した請求項16記載の菌株。

18. P.バストリスの菌株p1、p2、p5、p8、p13、p16又はp20から選択される請求項17記載の菌株。

19. 前記宿主菌株がヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子、アルギニノスクシネートリーゼ遺伝子、又はオロチシン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子から選択される少なくとも1種の栄養要求性マーカー遺伝子を欠き、前記DNAフラグメントが宿主菌株に欠けている栄養要求性マーカー遺伝子の完全形もコードしている請求項13記載の方法。

20. 請求項19記載の方法によって生成されるタンパク分解活性の欠損したピキア菌株。

21. プロティナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼY活性との欠損した請求項20記載の菌株。

22. 遺伝子の前記フラグメントがそれからの欠失の生成によって改質される請求項13記載の方法。

23. 前記宿主菌株がGS115であり、前記DNAフラグメントがプラスミドpDR401の約5.3kb SacI-EcoRIフラグメントである請求項19記載の方法。

24. ピキア属の野生型菌株に比べて、タンパク質分解活性の欠損したピキア属の酵母細胞であって、上記タンパク質分解活性がプロティナーゼBまたはプロティナーゼAおよびカルボキシペプチダーゼY活性であり、かつ、ピキアのPEP4またはPRB-1遺伝子によりコードされている上記酵母細胞。

25. プロティナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼY活性との欠損した請求項24記載の酵母細胞。

26. タンパク分解感受性組換え産物の発現方法であって、前記産物をコードするDNAによって請求項24記載の細胞を形質転換させ、前記細胞を前記タンパク分解感受性産物が発現されるような条件下で培養することを含む方法。

27. 発現時に、前記宿主生物のカルボキシペプチダーゼY活性に直接又は間接的に影響を及ぼすタンパク質をコードする細胞の遺伝子を、前記宿主菌株の

## DNAフラグメント。

7. 改質遺伝子が、その非改質形において、前記菌株のカルボキシペプチダーゼY活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする請求項1記載のDNAフラグメント。

8. 前記遺伝子がその中の栄養要求性マーカー遺伝子の挿入によって改質される請求項6記載のDNAフラグメント。

9. 前記栄養要求性マーカー遺伝子がピキアもしくはサッカロミセスHIS4遺伝子、ピキアもしくはサッカロミセスARG4遺伝子、又はピキアもしくはサッカロミセスURA3遺伝子から選択される請求項8記載のDNAフラグメント。

10. 前記フラグメントがプラスミドpDR401中に含まれる請求項9記載のDNAフラグメント。

11. 前記遺伝子がそれからの欠失の生成によって改質される請求項6記載のDNAフラグメント。

12. 前記フラグメントがプラスミドpDR421中に含まれる請求項11記載のDNAフラグメント。

13. ピキア属の宿主菌株に比べて、タンパク分解活性の欠損したピキア属菌株の形成方法であって、前記ピキア宿主菌株を請求項1記載のDNAフラグメントと、前記宿主菌株のゲノム中に前記DNAフラグメントを部位特異的に組込みに適した条件下で接触させることを含む、方法。

14. 前記接触の結果として得られる菌株を、前記宿主菌株に比べて低いタンパク分解活性を有する菌株の存在に関して検査する工程と：

前記宿主菌株に比べて低いタンパク分解活性を有するような菌株を選択する工程と

をさらに含む請求項13記載の方法。

15. 前記DNAフラグメントの組込みが前記宿主生物のプロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼY活性に変化をもたらす請求項13記載の方法。

16. タンパク質分解活性が欠損しており、かつ、請求項13記載の方法によって形成されるタンパク質分解活性の欠損したピキア菌株。

栄養要求性表現型を補足するマーカー遺伝子の挿入によって改質される前記遺伝子の欠失形によって組換えることによって、細胞のタンパク分解活性を欠損させ：かつマーカー遺伝子をヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子、アルギニノスクシネートリーゼ遺伝子、又はオロチシン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子から選択する請求項26記載の方法。

28. 下記宿主菌のゲノム中に下記DNAフラグメントを部位特異的に組込むに適した条件下で、ピキア宿主のタンパク質分解活性に影響を及ぼす産物をコードする遺伝子の修飾形を含むDNAフラグメントにピキア宿主菌を接触させることによりタンパク質分解活性を欠損する宿主菌を作成し；そして

タンパク質分解に感受性の産物を発現させる条件下で、タンパク質分解活性の欠損した、上記宿主菌を培養する

工程よりなるが、その際、上記タンパク質分解活性に影響を及ぼす産物をコードする遺伝子がピキアPEP4遺伝子またはピキアPRB-1遺伝子であって；

上記少なくとも1種の栄養要求性マーカー遺伝子を欠き、かつ前記宿主菌が転写の読み取りフレームにおいて、下記タクレオチド配列：

(i) メチロトローフ酵母のメタノール応反応性遺伝子のプロモーター領域；

(ii) 本質的に、

(a) 任意の分泌シグナル配列と、

(b) タンパク質分解感受性タンパク質と

から成るポリペプチドをコードする配列と、

(c) メチロトローフ酵母中の機能的転写始因子と、

を有する発現カセットを含む少なくとも1個のDNAフラグメントによって形質転換され、前記配列が前記ポリペプチドをコードする配列の転写に関して作用的に連結されている、上記方法。

29. 前記宿主菌が少なくとも2種の栄養要求性マーカー遺伝子を欠損する請求項26記載の方法。

30. 前記栄養要求性マーカー遺伝子がHIS4遺伝子とURA3遺伝子である請求項29記載の方法。

31. タンパク質分解感受性産物がIGF-1であり、IGF-1をコードす

特表平6-506117 (49)

るDNAによる前記宿主の形質転換に用いられるマークー遺伝子がHIS4遺伝子である請求項30記載の方法。

3.2. 宿主をタンパク分解活性欠損にさせるために用いられる改変遺伝子が、その非改変形において、宿主のカルボキシペプチダーゼ活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする請求項31記載の方法。

3.3. 改変遺伝子がコード配列の一部の欠失によって形成される請求項32記載の方法。

3.4. 前記組換え酵物を発現する組換え菌株が菌株M+IMB206S1である請求項33記載の方法。

3.5. ピキア属の種からのオルチジン-5'一ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子を含む単離DNAフラグメント。

3.6. 前記遺伝子が配列番号4に記載した配列と実質的に同じアミノ酸配列をコードする請求項35記載のDNAフラグメント。

3.7. 前記遺伝子が配列番号3に記載した配列と実質的に同じ核酸配列を有する請求項35記載のDNAフラグメント。

3.8. オルチジン-5'一ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子の欠損したピキア属の酵母細胞。

3.9. 前記酵母細胞がピキア・バストリスの菌株である請求項38記載の酵母細胞。

4.0. 前記酵母細胞が菌株ピキア・バストリスGS4-2である請求項39記載の酵母細胞。

4.1. さらにタンパク分解活性欠損を含む請求項38記載の酵母細胞。

4.2. プロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼY活性との欠損した請求項41記載の酵母細胞。

4.3. ピキア・バストリス菌株GS4-2521-3/7又はGS4-2521-4/1から選択される請求項42記載の酵母細胞。

4.4. 上記得られた株がピキアPEP4遺伝子およびピキアPRB-1により影響されるタンパク質分解活性に欠損を有するものである、請求項13記載の方法。

4.5. プロテイナーゼB、プロテイナーゼA活性およびカルボキシペプチダーゼY活性が欠損した請求項44記載の酵母細胞。

4.6. 上記遺伝子がピキアPEP4遺伝子である、請求項1記載のDNAフラグメント。

4.7. 上記遺伝子がピキアPRB-1遺伝子である、請求項1記載のDNAフラグメント。

手 続 捕 正 書

特許庁長官 麻生 渡 謙

平成 5年12月27日

1. 事件の表示

PCT/US92/02521  
平成4年特許願第509369号

2. 発明の名称

ピキア (Pichia) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子  
およびその使用

3. 捕正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国カリフォルニア州92037,  
ラ・ホーラ、コースト・ブルヴァード・サウス  
505

名 称 ザ・ソーカ・インスティチュート・  
バイオテクノロジー/インダストリアル・  
アソシエイツ・インコーポレーテッド

4. 代理人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル 206区  
電 話 3270-6641~6

氏 名 (2770) 弁理士 湯浅恭三

5. 捕正の対象

- (1) 出願人の代表者名を記載した国内書面
- (2) 委任状及び翻訳文
- (3) 国面翻訳文

6. 捕正の内容

別紙の通り(尚、上記(3)の書面の内容には変更なし)



手 続 捕 正 書

特許庁長官 麻生 渡 謙

平成 5年12月27日

1. 事件の表示

PCT/US92/02521  
平成4年特許願第509369号

2. 発明の名称

ピキア (Pichia) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子  
およびその使用

3. 捕正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国カリフォルニア州92037,  
ラ・ホーラ、コースト・ブルヴァード・サウス  
505

名 称 ザ・ソーカ・インスティチュート・  
バイオテクノロジー/インダストリアル・  
アソシエイツ・インコーポレーテッド

4. 代理人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル 206区  
電 話 3270-6641~6

氏 名 (2770) 弁理士 湯浅恭三

5. 捕正の対象

平成5年9月14日付提出の捕正書の翻訳文提出書の  
国面翻訳文

6. 捕正の内容

別紙の通り(尚、上記書面の内容には変更なし)



國 國 門 声 聲 告

BBE 110 - 20170801

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Application No. 91/00000	
According to International Patent Classification (IPC) or to less refined Classification and IPC			
Int.Cl. 5 C12N15/81; C12N15/93;		C12N15/57; C07K13/00	C12N15/53;
C12N15/60			
II. FIELDS SEARCHED			
International Classification System*			
Classification Systems		Classification Systems	
Int.Cl. 5		C12N	
Designations of countries other than International Organizations to which patent rights have been granted are indicated by the Polder System*			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category: "Classifications,"** with indication, where appropriate, of the relevant passages		Reference to Class No.3	
A	EP,A,0 336 056 (M & D RESEARCH CO) 11 October 1989 see page 1, last paragraph - page 2; claim 2	1	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, 1987, Columbus, Ohio, US; abstract no. 48594. C. NELSON AND T. YOUNG: "Yeast extracellular proteolytic enzymes for chill-proofing beer" page 505; column 1; and abstract and abstract and abstract vol. 198, no. 6, 1986, pages 599 - 603; ----- -----	1	
* Special categories of cited documents : "A" document relating to the general state of the art which is not cited as being essential to understand the principle or theory underlying the invention; "B" document which may show details on priority date(s) or which is cited to establish a date prior to the filing date of the application for purposes of article 4(a); "C" document pertaining to an earlier invention, one, publication or use of which may be relied upon under article 54(2)(b) or "D" document published prior to the international filing date in another country.			
** International classification used and international filing date and priority date and/or date of publication of the underlying document to understand the principle or theory underlying the invention;			
*** Mentioned of particular relevance the claimed invention as compared to the underlying document to which it is considered to relate;			
**** Mentioned of particular relevance the claimed invention as compared to the underlying document to which it is considered to relate;			
***** Mentioned of particular relevance the claimed invention as compared to the underlying document to which it is considered to relate;			
***** Mentioned of the main patent family			
IV. CERTIFICATION			
There is no formal Opposition of the International Search 11 AUGUST 1992		Date of mailing of this International Search Report 20.08.92	
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE		Signature of International Bureau VAN DER SCHAL C.A.	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		(CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)
Category	Classification of Document, with indication, where appropriate, of the relevant portion(s)	Reference to Claim No.
A	EP,A,0 390 876 (TRANSGENE S.A.) 8 October 1990 see the whole document ----	6,9,11, 12,14, 16,17, 19,22, 23,25, 28-30
A	BIOTECHNOLOGY vol. 7, no. 2, February 1989, NEW YORK US pages 160 - 164; M. DIGAN ET AL: 'Continuous production of a novel gamma-1,3-glucanase from the yeast, <i>Pichia pastoris'</i> see the whole document ----	32
A	WD,A,9 009 448 (HENKEL RESEARCH CORPORATION) 23 August 1990 see abstract; claims ----	22,31, 32,34, 39-45
A	GENE vol. 29, 1984, AMSTERDAM NL pages 113 - 124; M. ROSE: 'Structure and function of the yeast URA3 gene: expression in <i>Escherichia coli</i> ' see the whole document ----	39
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 6, no. 7, July 1986, WASHINGTON, US pages 2490 - 2499; G. AMMERER ET AL: 'PEP4 gene of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> encodes Protease A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors' see abstract; figure 2 -----	2,5,10, 18,20, 24,25, 31,36,47

四 級 别 声 频 告

US 9202321

This section lists the present family members relating to the patient deceased cited in the above-mentioned International search report. The comments are as contained in the European Patent Office EPO File PCT.

Power demand used in source report	Publication date	Power Audit number(s)	Publication date
EP-A-0336055	11-10-89	JP-A- 2049845 US-A- 5053333	01-08-89 10-02-90 01-10-91
EP-A-0390876	03-10-90	PR-A- CA-A- JP-	05-10-90 05-09-90 29-03-91
WAT-A-9094499	23-06-90	EP-A-	0467852
			27-11-91

フロントページの続き

(51) Int.Cl.  
C 12 N 15/60  
15/81  
//(C 12 N 1/19  
C 12 R 1:84)

(72)発明者 ハワード, ブラッドレー・ドレイク  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92109,  
サン・ディエゴ, グランド・アベニュー  
1361, ナンバー10